

SÉRIE U
N° D'ORDRE : 366

THÈSE

PRÉSENTÉE

**A LA FACULTÉ DE PHARMACIE
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS**

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
(Mention Pharmacie)

PAR

Pierre BUOT

Pharmacien

Diplômé de Bactériologie, Sérologie, Hématologie,
Parasitologie et Chimie Biologique

Ancien élève de l'Institut de Pharmacie Industrielle

**CONTRIBUTION A LA MISE EN ÉVIDENCE
D'UNE ACTIVITÉ TRICHOMONACIDE IN VITRO**

Soutenue le 19 AVR 1963, devant la Commission d'Examen.

Jury { MM. R. CAVIER, Président
A. GERMAN, Professeur
J. SAVEL, Maître de Conférences

SEDES
PARIS

SÉRIE U,
N° D'ORDRE : 366

THÈSE

PRÉSENTÉE

**A LA FACULTÉ DE PHARMACIE
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS**

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
(Mention Pharmacie)

PAR

Pierre BUOT

Pharmacien

Diplômé de Bactériologie, Sérologie, Hématologie,
Parasitologie et Chimie Biologique
Ancien élève de l'Institut de Pharmacie Industrielle

**CONTRIBUTION A LA MISE EN ÉVIDENCE
D'UNE ACTIVITÉ TRICHOMONACIDE IN VITRO**

Soutenue le **19 AVR 1963**, devant la Commission d'Examen.

Jury { MM. R. CAVIER, Président
A. GERMAN, Professeur
J. SAVEL, Maître de Conférences

SOCIÉTÉ D'ÉDITION D'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR
5, place de la Sorbonne - Paris (V^e)



Digitized by the Internet Archive
in 2026

A LA MÉMOIRE DE MON BEAU-PÈRE,

Agrégé de l'Université,

A MA FEMME,

Pharmacien, dont le dévouement m'est d'un précieux secours,

A MES ENFANTS,

A MON PÈRE,

Pharmacien, ex-interne des Hôpitaux de Paris,

A MA MÈRE,

En témoignage de ma profonde affection.

A MA FAMILLE,

A MES AMIS,

A TOUS CEUX QUE J'ESTIME.

A MON MAITRE ET PRÉSIDENT DE THÈSE,

MONSIEUR LE PROFESSEUR RAYMOND CAVIER,

*Professeur de Parasitologie à la Faculté de Pharmacie de Paris,
Pharmacien en Chef du Groupe Hospitalier Paul-Brousse,*

qui a bien voulu m'accueillir dans son laboratoire
et m'a guidé avec tant de sollicitude.

A qui je dois l'intérêt que je porte à la recherche.

En témoignage de ma profonde reconnaissance et
de mon respectueux attachement.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR ALBERT GERMAN,

*Professeur de Virologie et de Sérologie à la Faculté de Pharmacie
de Paris,
Pharmacien des Hôpitaux de Paris,*

qui nous fait l'honneur de juger ce travail.

Hommage de respectueuse reconnaissance.

A MONSIEUR JEAN SAVEL,

*Maître de Conférences agrégé à la Faculté de Pharmacie de Paris,
Chef de Laboratoire des Hôpitaux de Paris,*

dont la présence dans notre jury nous honore.

Qui nous a fréquemment conseillé au cours de ces
travaux.

Qu'il veuille bien accepter nos très sincères et
amicaux remerciements.

PERSONNEL DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS

ADMINISTRATION

MM.	G. VALETTE, O. ✱, C. 	Doyen.
	M. M. JANOT, O. ✱, C. 	Assesseur.
	L. RODINEAU, ✱, O. 	Secrétaire Général.
	L. JEANDEL, O. 	Secrétaire Général Adjoint.
M ^{me}	S. CERTAIN, O. 	Secrétaire.
	M. L. ESPINASSE, O. 	Secrétaire.

DOYEN HONORAIRE

M.	R. FABRE, C. ✱, C. 	{	Président de l'Académie de Médecine, Membre de l'Institut.
----	--	---	--

PROFESSEURS HONORAIRES

MM.	M. DELEPINE, C. ✱, C. 		Membre de l'Institut.
	L. LAUNOY, O. ✱, O. 		
	P. FLEURY, O. ✱, O. 		
	M. MASCRE, O. ✱, C. 		
	M. PICON, O. ✱, O. 		
	C. BEDEL, ✱, O. 		
	R. FABRE, C. ✱, C. 		{ Président de l'Académie de Médecine, Membre de l'Institut.

PROFESSEURS

MM.	M. M. JANOT, O. ✱, C. 	Pharmacie galénique (T.).
	G. VALETTE, O. ✱, C. 	Pharmacodynamie (T.).
	R. PARIS, ✱, O. 	Histoire naturelle des médicaments simples d'origine végétale (T.).
	M. GUILLOT, ✱, O. 	Physique (T.).
	J. GAUTIER, ✱, O. 	Chimie organique (T.).
M ^{lle}	S. LAMBIN, ✱, O. 	Microbiologie (T.).
MM.	Y. RAOUL, ✱, O. 	Physiologie (T.).
	J. COURTOIS, ✱, O. 	Chimie biologique (T.).
	L. DOMANGE, ✱, O. 	Chimie minérale (T.).
	P. CRETE, ✱, O. 	Botanique (T.).
	R. TRUHAUT, O. ✱, O. 	Toxicologie et Hygiène indus- trielle (T.).
	A. MORETTE, ✱, O. 	Hydrologie (T.).

R. CAVIER, O. 	Parasitologie (T.).
A. QUEVAUVILLER, O. 	Hygiène et Education sanitaire (T.).
R. MOREAU,  , O. 	Pharmacie chimique (T.).
MM. J. GUY, O. 	Mathématiques appliquées aux sciences physiques et biologiques (T. P.).
A. GERMAN, O. 	Virologie et Sérologie (T. P.).
M. PIETTE, O. 	Biologie sanguine (T. P.).
P. MALANGEAU, 	Chimie analytique (T.).
M. GIRARD, O. 	Chimie appliquée à l'expertise (T.).
G. DILLEMAN	Législation, Déontologie et Histoire de la Pharmacie (T.).
J. FLAHAUT, 	Minéralogie (T. P.).
G. DEYSSON, O. 	Professeur sans chaire.
A. LE HIR	Professeur sans chaire.
J. RENAULT, 	Professeur sans chaire.
C. BOUDENE	Professeur sans chaire.

MAITRES DE CONFÉRENCES

MM. Y. COHEN	Sciences naturelles.
P. LARUELLE	Physique.
G. LE MOAN	Toxicologie.
P. ROSSIGNOL	Pharmacodynamie.
H. RENAULT, 	Pharmacie chimique.
C. PAOLETTI	Sciences appliquées.
A. MANGEOT, O. 	Chimie analytique.
P. DELAVEAU	Matière médicale.
A. DESVIGNES, 	Microbiologie.
F. PERCHERON	Biochimie.
J. SAVEL	Sciences naturelles.
P. REYNAUD	Sciences physico-chimiques.
J. BORY	Sciences naturelles.
J. POISSON	Sciences naturelles.

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

MM. P. BINET	Parasitologie.
A. CAVE (FF)	Pharmacotechnie chimique et galénique.
P. CORRIEZ	Physique.
C. DREUX	Electrochimie appliquée à l'analyse.
P. GESTEAU,  , O. 	Physique biologique.
J. GOUNELLE	Analyse appliquée au contrôle des médicaments (Section Biologie).
H. GUÉRIN	Micrographie (3 ^e année), Biologie végétale.
J. HARISPE, O. 	Chimie générale et pharmaceutique.
J. HENRY	Chimie (4 ^e année).
M ^{me} J. HUBERT	Microbiologie.

MM. R. LELUC.....	Microbiologie.
M. LEMONNIER	Chimie analytique (2 ^e et 3 ^e années).
M ^{me} S. LEMONTEY	Chimie (4 ^e année).
M ^{lle} S. LONGUEVALLE, O. 	Service des examens de chimie
M ^{lle} H. MORIN, 	Pharmacodynamie et essais biologiques des médicaments
MM. F. PELLERIN	Chimie analytique (2 ^e et 3 ^e années).
R. PERLES	Chimie biologique.
J. PESTIS (F. F.)	Biologie animale.
R. POULLAIN.....	Hématologie.
M ^{me} M. ROBERT	Sérologie.
M ^{lle} A. ROLLEN,  	Biologie végétale.
M ^{lle} L. SEGUIN (F. F.)	Analyse appliquée au contrôle des médicaments. (Section Physico-Chimie).
M ^{me} SEILLER (F. F.)	Pharmacie galénique industrielle.
M. J. YONGER (F. F.)	Chimie analytique (1 ^{re} année).

INSTITUT DE PHARMACOTECHNIE ET DE PHARMACODYNAMIE

MM. J. MANDEREAU	Chef de travaux pratiques de pharmacotéchnie galénique.
N.	Chef de travaux pratiques de pharmacodynamie.
N.	Chef de travaux pratiques de pharmacotéchnie chimique.

BIBLIOTHÈQUE

M ^{lle} Y. RUYSEN,  O. 	Conservateur, chargé de la Direction.
M ^{lle} S. LAVAUD, O. 	Conservateur.
M ^{me} G. KREHMER, O. 	Conservateur.
M ^{me} A. DESGRIPPES, O. 	Bibliothécaire.

INTRODUCTION

Importance de la Trichomonase en pathologie humaine

Lorsque Monsieur le Professeur CAVIER voulut bien, il y a déjà quelques années, nous compter parmi ses élèves du Laboratoire de Parasitologie de la Faculté de Pharmacie de Paris, c'est avec un vif plaisir que nous acceptons comme sujet d'étude une contribution à la mise au point de tests *in vitro* destinés à mettre en évidence l'activité de substances trichomonacides.

Cette contribution appliquée à un domaine qui échappe encore à la standardisation essaiera d'apporter quelques précisions et conclusions susceptibles d'aider les chercheurs désireux de s'intéresser à cette branche de la protistologie dont l'étude est encore loin d'être épuisée.

De nombreux Médecins, Biologistes, Parasitologues et Pharmacologues de toutes nationalités se sont penchés depuis longtemps sur l'étude des Trichomonas, et peu à peu nos connaissances dans ce domaine se sont enrichies.

La biologie du parasite est maintenant mieux connue, de nombreux milieux de culture ont été proposés et permettent de l'isoler et de l'entretenir dans des conditions satisfaisantes ; enfin, des substances antibiotiques ou chimiothérapiques efficaces ont été mises au point et ont rendu possible la guérison de cette affection si répandue qu'est la trichomonase vaginale.

Découvert par DONNE en 1836 (23) dans les sécrétions pathologiques des organes génitaux de l'homme et de la femme, ce protozoaire fut baptisé par lui *Tricho-monas vaginale* ; en effet, « il se rapproche des Monas par sa trompe (*) et des Trichodes par ses cils, mais il constitue, par la réunion de ces deux organes, un genre nouveau ».

Après cette découverte et pendant près de quatre-vingts ans, seuls les Parasitologues semblèrent s'intéresser à l'observation de

(*) **Trompe** : les mouvements de la membrane ondulante et la forme de la cellule avaient fait penser à DONNE que le parasite possédait une sorte de trompe.

Trichomonas Vaginalis ; de nombreux chercheurs^s confirmèrent sa présence dans le mucus vaginal (30), d'autres le mirent en évidence dans les voies urinaires de la femme et de l'homme.

KUNSTLER (41), DAVAINÉ (18), enfin LYNCH (49) (50) montrèrent en 1915 la pluralité des différentes espèces de *Trichomonas* parasites de l'homme : *Trichomonas vaginalis*, *Trichomonas buccalis*, *Trichomonas intestinalis*. Pendant toute cette période, *Trichomonas vaginalis* fut considéré comme un commensal du vagin.

C'est HOEHNE (35) en 1916 qui, le premier, évoqua le rôle pathogène de *Trichomonas vaginalis* et le considéra comme l'agent de certaines vaginites purulentes. Ultérieurement, de nombreux chercheurs anglo-saxons et allemands confirmèrent les constatations de HOEHNE.

En 1932, le Français VIGNES (74) fait le point des connaissances acquises dans ce domaine ; mais il faut attendre encore quelques années pour que tous les Cliniciens reconnaissent le rôle capital du parasite dans l'étiologie d'un grand nombre de vaginites.

Actuellement, si l'on s'en tient aux travaux statistiques de CHAPPAZ (13), 50 % des malades atteintes de leucorrhées non gonococciques sont porteuses de trichomonas et 10 % des femmes françaises sont atteintes de vaginites causées par ce même parasite.

La grande majorité des leucorrhées, qui sont des signes de vaginites ou de lésions cervicales, s'explique de nos jours par la présence de *Trichomonas vaginalis* dans les voies génitales de la femme ; plus rares sont les vaginites mycosiques qui occupent par leur fréquence la seconde place dans l'étiologie des leucorrhées, leur augmentation allant de pair avec l'inflation de l'antibiothérapie qui réduit les moyens de défense du milieu vaginal. Le champignon responsable appartient généralement au genre *Candida* et à l'espèce *albicans*. Puis viennent les vaginites à *Bacillus hemophilus glucidophilus vaginalis*, petit bacille Gram —, responsable d'après WURCH et LUTZ de 20 % des leucorrhées.

La vaginite gonococcique est beaucoup moins fréquente qu'autrefois, on la rencontre parfois associée à une vaginite à *Trichomonas*.

Rares enfin sont les vaginites à Staphylocoques ou à germes divers dont il faut toutefois mentionner ici l'existence.

Après avoir souligné l'importance de la Trichomonase en pathologie humaine, ajoutons que cette affection est maintenant reconnue comme étant aussi fréquente chez l'homme que chez la femme, cette constatation étant du plus haut intérêt pour expliquer sa pathogénie.

La Trichomonase de l'homme est restée longtemps méconnue car difficile à diagnostiquer, en raison de l'absence fréquente de symptômes.

On trouve le parasite soit à l'état frais après examen de l'urètre ou plutôt par culture. HARKNESS (29) l'a trouvé dans 15,3 % de 326 cas d'urétrites non gonococciques.

JIRA (35) insiste sur la nécessité de répéter les examens et d'effectuer cette recherche, non seulement sur la sécrétion urétrale mais aussi sur la sécrétion prostatique. CHAPPAZ (14), enfin, souligne l'intérêt de la spermoculture dans les cas douteux.

L'examen de la partenaire a montré une telle proportion de positivité que l'on peut admettre qu'elle coïncide presque toujours avec l'infestation de l'homme.

Tous les auteurs sont unanimes pour admettre que la transmission se réalise, dans la plupart des cas, par les rapports sexuels.

Il faut donc considérer la Trichomonase comme une maladie vénérienne, l'homme contribuant à disséminer un parasite qui trouve au niveau du vagin un milieu particulièrement favorable à sa prolifération.

Les vaginites à *Trichomonas* sont à l'origine de troubles nombreux : leucorrhées, prurit, métrorragies, troubles menstruels et parfois dyspareunies dont les conséquences sociales ne peuvent échapper.

Ajoutons que cette affection est particulièrement rebelle aux très nombreuses médications proposées jusqu'alors. Les rechutes sont fréquentes et il est nécessaire d'associer un traitement général au traitement local pour obtenir la guérison définitive. Enfin, le traitement simultané du partenaire masculin est indispensable, étant donné le rôle qu'il joue dans la propagation de la maladie.

*
**

Malgré la découverte récente de substances trichomonacides de grande activité, le Chimiste se doit de proposer inlassablement de nouveaux produits au Pharmacologue dont la mission est d'en réaliser le triage. Cette opération d'une grande importance permettra de retenir un petit nombre de substances qui, après étude pharmacologique suffisante, seront présentées au Clinicien en vue de l'expérimentation clinique.

Deux méthodes d'essais sont actuellement utilisées dans les laboratoires pour étudier l'action trichomonacide d'un médicament : les méthodes d'essais *in vitro* et les méthodes d'essais *in vivo*.

1°) Méthodes d'essais *in vitro* :

Elles précèdent les essais *in vivo* et permettent d'effectuer une première sélection des produits par élimination des substances inactives. De nombreuses techniques ont été proposées, la plupart

sont des techniques en *tubes* qui consistent à déterminer, pour un produit donné, la concentration minimum capable de provoquer la mort des flagellés entretenus en cultures et associés à une flore microbienne variée.

Ces méthodes d'essais seront décrites dans la première partie de ce travail.

Notons, dès à présent, que de nombreux facteurs peuvent intervenir et fausser la valeur de ces essais ; citons entre autres :

a) *La composition du milieu de culture :*

L'adsorption des substances à essayer sur le sérum coagulé des milieux diphasiques nous amènera à proposer des milieux monophasiques plus simples qui, par ailleurs, auront l'avantage de favoriser la stabilisation des souches dans le temps.

Nous tenterons de définir le rôle du sérum dont la présence est indispensable dans la phase liquide et nous comparerons les résultats obtenus avec des milieux de composition très différente.

b) *La nature de la souche :*

Chaque souche possédant une certaine individualité, les différences de résistance vis-à-vis des substances toxiques peuvent être parfois considérables, quels que soient les milieux utilisés.

c) *La stabilité de la souche :*

Une technique d'essai ne peut être retenue que si elle s'adresse à une souche parfaitement stable, les résultats devant être reproductibles dans le temps.

Nous verrons plus loin qu'une certaine stabilité ne peut être obtenue qu'après une période d'entretien suffisante sur le milieu considéré.

d) *Le rôle de la flore associée :*

Elle peut varier quantitativement au cours du vieillissement de la souche et intervenir sur la résistance des flagellés vis-à-vis des substances essayées.

Cet inconvénient, susceptible de diminuer la valeur des tests effectués à de grands intervalles de temps, nous amènera à préférer la culture pure à la culture mixte, c'est-à-dire avec flore microbienne associée.

Le but de notre travail a été de chercher à définir les conditions dans lesquelles une technique d'essais *in vitro* simple et rapide peut suffire à la sélection des substances proposées.

Parmi les nombreux essais que nous avons effectués sur des milieux divers et dans des conditions différentes, nous avons été conduits à préférer la technique d'essai dont les résultats sont les plus reproductibles dans le temps.

D'autre part, parallèlement aux essais en *tubes*, nous avons mis au point des tests en *cellules*. Dans ces méthodes d'essai, les parasites sont mis directement en contact, sur des cellules, avec des concentrations variées de substances et on recherche quelles sont les concentrations capables de tuer la majeure partie des flagellés en un temps variant de une heure à six heures.

2°) Les techniques d'essais *in vivo* :

Ces techniques, qui ne font pas l'objet de notre travail, doivent compléter et confirmer les résultats obtenus *in vitro*. Les plus récentes, qui ont été mises au point dans ce Laboratoire, reposent sur la possibilité d'implanter le parasite dans le vagin de la Rate castrée et maintenue en œstrus permanent grâce à l'injection de suspension microcristalline d'œstrogènes à action lente et prolongée. CAVIER et MOSSION (7) et (8), et MOSSION (59).

Ainsi, pour la première fois, a été obtenue une infestation sûre et régulière d'un animal de laboratoire.

CAVIER, SABEL et Mlle QUEMERAIS (10) (9) ont alors proposé une technique d'essai *in vivo* qui réalise les conditions expérimentales proches des conditions naturelles dans lesquelles vit et se développe *Trichomonas vaginalis*.

Les résultats obtenus, en appliquant ce test à l'étude de médicaments trichomonacides récents, sont en parfaite concordance avec les données de la clinique.

PLAN SOMMAIRE DE L'OUVRAGE

Première Partie : **Travaux antérieurs.**

- Chapitre I : Généralités sur les Trichomonas.
- Chapitre II : Etude de la flore associée à Trichomonas vaginalis, son rôle *in vivo* et *in vitro*.
- Chapitre III : Les milieux de culture utilisés pour l'entretien des souches et pour les essais *in vitro*.
- Chapitre IV : Les techniques utilisées pour la détermination *in vitro* de l'activité trichomonacide et trichomonastatique de différentes substances.

Deuxième Partie : **Travaux personnels.**

But de nos travaux et généralités sur le choix d'une technique d'essai.

- Chapitre I : Les milieux utilisés pour l'entretien de nos souches et pour nos essais *in vitro*.
- Chapitre II : Etude générale des souches de Trichomonas.
- Chapitre III : Substances trichomonacides utilisées dans nos travaux.
- Chapitre IV : Essais d'activité trichomonacide effectués en tubes de culture :
 - A. - Technique utilisée pour les essais en tubes.
 - B. - Résultats obtenus :
 - expression des résultats,
 - discussion des résultats,
 - interprétation générale et choix d'une substance étalon.
- Chapitre V : Essais d'activité trichomonacide effectués en cellules de Nageotte :
 - A. - Description des techniques utilisées.
 - B. - Résultats obtenus :
 - expression des résultats,
 - étude comparative des résultats,
 - discussion des résultats et étude critique de ces essais.

Conclusion :

Proposition d'une technique en tubes pour les essais *in vitro*.

Avant d'aborder l'exposé de nos recherches, qu'il nous soit permis de remercier très vivement notre Maître, Monsieur le Professeur CAVIER, pour la confiance qu'il a bien voulu nous accorder en nous proposant un sujet d'un intérêt aussi évident. Ces années d'étude nous ont permis d'acquérir l'habitude des manipulations délicates et précises et nous ont donné l'expérience du travail dans les conditions d'asepsie rigoureuse.

C'est à Monsieur CAVIER que nous devons cette formation nécessaire à tout chercheur s'intéressant à la Parasitologie et nous ne saurions oublier que les conseils qu'il nous a toujours prodigués, avec une si grande bienveillance, nous ont seuls permis de mener à bien ces quelques recherches.

Nous lui sommes aussi très reconnaissant pour l'honneur qu'il veut bien nous faire en présidant ce jury.

Qu'il soit persuadé de notre très sincère et profonde gratitude.

Nos très vifs remerciements aussi à Monsieur le Professeur GERMAN, dont nous avons été autrefois l'élève au Certificat supérieur de Bactériologie, qui a accepté si aimablement de s'intéresser à notre travail et a bien voulu faire partie de notre jury de thèse.

Nos remerciements tout particuliers à Monsieur Jean SAVEL, Maître de Conférences agrégé à la Faculté de Pharmacie de Paris, qui nous a fait l'honneur et le plaisir de bien vouloir nous juger.

Son aide amicale nous a été précieuse et nous avons, très souvent, tiré profit de sa haute compétence dans le domaine de la Biologie animale.

J'adresse enfin mes sincères remerciements et mon amicale reconnaissance à tous mes camarades du laboratoire de Parasitologie qui ont su créer une atmosphère de cordialité et d'entraide génératrice d'un travail profitable.

Parmi eux, je remercierai particulièrement Mademoiselle CHARBROL pour l'aide efficace qu'elle nous a apportée, tant à la Faculté qu'à notre laboratoire personnel.

TRAVAUX ANTÉRIEURS

GÉNÉRALITÉS SUR LES TRICHOMONAS

I. — PLURALITÉ DES ESPÈCES DE TRICHOMONAS

Les *Trichomonas* sont des zooflagellés des cavités ouvertes appartenant à l'Ordre des Trichomonadines, caractérisés par la présence d'un axostyle, de 3 à 6 flagelles, dont un récurrent, et d'un appareil parabasal bien développé. Selon le nombre des flagelles, on les désigne sous les noms de tri, tétra, penta, ou hexa-trichomonas.

Les *Trichomonas* appartiennent à la sous-famille des Trichomonadines dont le caractère distinctif est la présence d'un flagelle postérieur relié au corps par une membrane ondulante qui repose sur une sorte de côte (costa).

Ces flagellés peuvent parasiter l'homme et les animaux et exercer ou non une action pathogène.

Parmi les *Trichomonas* parasites des animaux, citons entre autres :

1°) *Trichomonas fœtus*, parasite cosmopolite qui provoque, chez les Bovidés, la maladie de Bang, à localisation strictement génitale.

2°) *Trichomonas gallinæ* (*Trichomonas columbæ*), agent de la Trichomonase aviaire (atteinte de la partie supérieure du tube digestif chez les oiseaux colombiformes).

3°) *Trichomonas parva* et *Trichomonas muris*, flagellés propres aux Rats, sont essentiellement des parasites du cæcum où ils prolifèrent abondamment (27). On les rencontre fréquemment dans les déjections de ces animaux, mais ils ne peuvent pas se développer dans leurs cavités vaginales. Cette constatation permet de rejeter toute infestation du vagin de la Rate par *Trichomonas parva* au cours des essais d'infestation vaginale de ces animaux par *Trichomonas vaginalis*.

Les trois principales espèces de *Trichomonas* parasites de l'homme sont :

1°) *Trichomonas tenax* (MULLER, 1875) = *tétratrichomonas buccalis* (GOODEY, 1917) = *Trichomonas elongata* (STEINBERG, 1862). C'est un hôte fréquent de la cavité buccale, il n'est pas pathogène.

2°) *Trichomonas intestinalis* (LEUCKART, 1879) = *Pentatrichomonas hominis* (DAVAINE, 1860).

Parasite du gros intestin, il peut provoquer, en cas d'intense pullulation, des colites et des diarrhées. On le rencontre moins fréquemment dans les fèces que *Giardia intestinalis*, agent de la Lambliaose très répandue dans nos régions, et beaucoup plus pathogène que *Trichomonas intestinalis*.

3°) *Trichomonas vaginalis* :

C'est l'espèce de *Trichomonas* humain la plus pathogène.

Agent de la Trichomonase vaginale, c'est un parasite sténoxène du tractus génito-urinaire.

Ces différents flagellés paraissent, de prime abord, offrir une morphologie identique ; aussi, a-t-on été longtemps dans l'incertitude de leur identité ou de leur pluralité.

Jusqu'en 1934, la théorie uniciste a prévalu, soutenue par les protistologues DOBELL et ANDREWS (1). On estimait alors que les différences morphologiques remarquées entre *Trichomonas vaginalis* et *Trichomonas intestinalis* étaient probablement déterminées par l'adaptation d'une seule et même espèce à des milieux différents.

De nos jours, l'individualité des trois espèces parasites de l'Homme semble définitivement établie. Nous allons rapporter brièvement les données morphologiques, biologiques et expérimentales qui ont permis d'affirmer l'individualité de ces flagellés.

II. — CARACTÈRES DISTINCTIFS DES TRICHOMONAS HUMAINS

1°) Caractères morphologiques communs aux trois espèces :

Le corps des *Trichomonas* est ovoïde ou arrondi ; il est constitué par un cytoplasme granuleux contenant des inclusions sidérophiles et des vacuoles alimentaires. Le cytoplasme est limité d'un côté par une membrane ondulante dont la longueur varie suivant les espèces. On nomme cytostome une zone claire située en position antéro-latérale.

Au sein du protoplasme, on peut décrire un certain nombre d'organites :

a) le noyau : à la partie antérieure du corps.

b) les éléments de soutien et à fonction cinétique issus d'un blépharoplaste qui sont :

1. — *Éléments de soutien* :

- l'*axostyle*, sorte de squelette axial qui, renflé dans sa partie antérieure, s'effile dans sa partie postérieure pour dépasser nettement le corps du flagellé ;
- le *corps parabasal*, organite allongé et incurvé dont les fonctions sont énigmatiques.

2. — *Éléments à fonction cinétique* :

- les *flagelles*, au nombre de 4 à 5 libres, sans compter celui qui soutient la membrane ondulante.

La membrane ondulante, l'*axostyle* et les *flagelles* peuvent être mis en évidence par la coloration de MAY-GRÜNWARD GIEMSA et par l'hématoxyline ferrique.

2°) Tableau résumant les caractères morphologiques distinctifs des *Trichomonas* humains, d'après Wenrich (75) et Grasse (27).

	<i>Trichomonas vaginalis</i>	<i>Trichomonas intestinalis</i>	<i>Trichomonas tenax</i>
Taille	10 à 15 μ et au-dessus	8 à 10 μ en moyenne	5 à 6 μ
Membrane ondulante .	s'arrête au tiers postérieur du corps	s'étend sur toute la longueur du corps	un peu moins longue que le corps
Noyau	ovalaire : — 4 chromosomes d'après POWELL — caryosome très discret	arrondi : — 5 chromosomes d'après BISHOP — caryosome central peu visible	arrondi : — 3 chromosomes d'après HINSHAW — caryosome très discret
Corps parabasal	bien développé	nul	bien développé
Blépharoplaste	simple, rarement deux éléments égaux	deux blépharoplastes de taille inégale, le plus petit en position ventrale	simple, rarement deux éléments égaux
Flagelles ..	4 flagelles antérieurs (<i>Tétratrichomonas</i>)	5 flagelles antérieurs (<i>Pentatrichomonas</i>) (rarement 4)	4 flagelles antérieurs (<i>Tétratrichomonas</i>)

3°) Tableau résumant les caractères biologiques distinctifs des *Trichomonas* humains

	<i>Trichomonas vaginalis</i>	<i>Trichomonas intestinalis</i>	<i>Trichomonas tenax</i>
Localisation	essentiellement vaginale ou urétrale	intestinale (côlon)	buccale
Mobilité ...	assez grande <i>in vivo</i> . Varie <i>in vitro</i> suivant les milieux	très grande <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>	très grande <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>
Résistance dans le milieu extérieur	fragile, se développe seulement à 37° C	peu fragile, se développe à 20° C	peu fragile, se développe à 20° C
pH optimal	5,5 à 5,8	6,5	6,5
Rôle de l'anaérobiose	développement favorisé par l'anaérobiose	développement non favorisé par l'anaérobiose	développement non favorisé par l'anaérobiose
Rôle du sérum sanguin <i>in vitro</i>	indispensable : — au minimum 1 % de sérum dans les milieux	indispensable : — on a pu entretenir <i>T. intestinalis</i> avec 0,5 % de sérum seulement	indispensable — on a pu entretenir <i>T. tenax</i> avec 0,5 % de sérum seulement

Il ressort de ces tableaux que les trois espèces de *Trichomonas* humains sont morphologiquement et biologiquement distinctes.

On peut noter cependant que *Trichomonas vaginalis* et *Trichomonas tenax* sont morphologiquement assez voisins et qu'ils se différencient nettement de *Trichomonas intestinalis*.

Mais ce sont surtout les infestations expérimentales de l'Homme qui sont venues confirmer la théorie pluraliste :

— WESTPHAL, en 1936, réalisa l'expérience cruciale suivante :

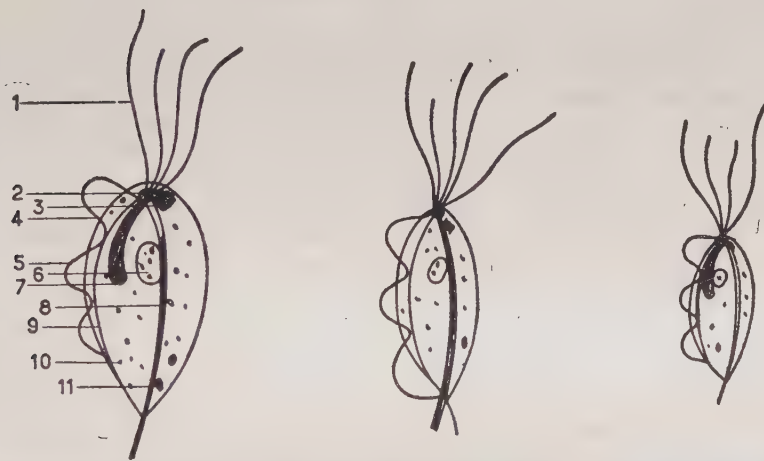
Après s'être assuré qu'il n'hébergeait aucun *Trichomonas* intestinal ou buccal, il ingéra, à plusieurs reprises, des souches de *Trichomonas vaginalis* ; il ne s'ensuivit aucune infestation buccale ou intestinale.

— Il répéta la même expérience avec *Trichomonas tenax* ; sa bouche fut parasitée, mais aucun *Trichomonas* n'apparut dans l'intestin.

— Enfin, il absorba des souches de *Trichomonas intestinalis* et contracta une Trichomonase intestinale tenace ; dans cette dernière expérience, aucun *Trichomonas* ne fut décelé dans la cavité buccale.

Ajoutons que tous les essais d'infestation du vagin par *Trichomonas intestinalis* ou *Trichomonas tenax* ont toujours complètement échoué.

LES TRICHOMONAS HUMAINS



Trichomonas vaginalis

Trichomonas intestinalis

Trichomonas tenax

- 1 - Flagelles
- 2 - Blépharoplaste
- 3 - Cytostome
- 4 - Flagelle récurrent
- 5 - Membrane ondulante
- 6 - Noyau

- 7 - Corps parabasal
- 8 - Axostyle
- 9 - Costa
- 10 - Grains sidérophiles
- 11 - Vacuoles alimentaires.

4°) Considérations sur les variations in vitro de certains caractères morphologiques des *Trichomonas* humains :

On voit donc qu'il existe, entre les *Trichomonas* parasites de l'Homme, certaines différences morphologiques, des caractères biologiques distincts, et, surtout, des localisations spécifiques utilisables pour leur caractérisation.

Cependant, si l'on considère généralement qu'*in vitro* les caractères décrits précédemment sont fixes et qu'ils peuvent permettre d'identifier une espèce inconnue de *Trichomonas* — ceci d'autant plus facilement qu'on en connaît l'origine — il en va autrement lorsqu'il s'agit d'une souche entretenue en culture, et dont l'origine n'a pas été précisée.

En effet, les conditions de vie du parasite peuvent, dans certains cas, apporter de profondes modifications à sa morphologie et à sa mobilité.

A. — Variation de forme, de taille et de mobilité :

a) Cas de cultures âgées ou de milieux défavorables :

Sur les milieux peu favorables au développement et à la multiplication des flagellés, ou encore sur les cultures âgées, on observe souvent la formation de formes dites de souffrance. On remarque une rapide altération de la morphologie normale avec passage progressif à des formes rondes, granuleuses, peu mobiles dont les flagelles s'appliquent alors sur le corps, devenant ainsi difficiles à distinguer.

Il n'est pas rare d'observer des formes géantes dont la formation — comme nous le verrons — est fonction de l'état du milieu ambiant. Certains auteurs, dont TRUSSEL (70), estiment que ces *Trichomonas* de grande taille sont, soit des formes sur le point de se diviser, soit des parasites ayant passé le stade de leur plus grande vitalité et commençant à dégénérer.

Ces formes géantes conservent souvent alors une certaine mobilité, mais il devient difficile de distinguer leur membrane ondulante.

Si les conditions de vie deviennent encore moins bonnes, le mouvement des cellules n'est plus perceptible, et seule une longue observation permet de saisir le mouvement d'un flagelle ; le protoplasme se charge de granulations : c'est la phase qui précède la mort et la lyse des parasites, les subcultures pratiquées à partir de ces formes étant presque toujours négatives.

b) Cas des flagellés soumis à l'action d'un *Trichomonacide* :

Lorsqu'on soumet à l'action d'une substance trichomonacide des flagellés très mobiles, on observe, dans la plupart des cas, pour une concentration convenable de produit et après un contact suffisant, un phénomène analogue.

Là aussi, il y a passage aux formes rondes, granuleuses, peu mobiles qui précèdent la mort et la lyse des flagellés.

Dans ce cas particulier, nous n'avons jamais observé la formation de cellules géantes.

c) *Variation de la morphologie de Trichomonas vaginalis sur certains milieux favorables à son développement et à sa multiplication :*

Certains milieux, que nous considérons comme favorables au développement et à la reproduction des flagellés, sont susceptibles de modifier leur morphologie. Il apparaît alors des formes rondes qui gardent une grande mobilité. Nous reparlerons de ce phénomène dans la deuxième partie de cet exposé.

B. — *Observations d'ANDREWS sur l'allongement in vitro de la membrane ondulante (1) :*

ANDREWS, en 1929, utilisa pour l'entretien de *Trichomonas vaginalis* le milieu de TANABE et CHIBA, milieu diphasique dont la phase solide est à base de gélose, d'asparagine et de soluté de RINGER, et la phase liquide de soluté de RINGER, de sérum et d'amidon.

Elle remarqua que, dans ces conditions, les flagellés devenaient plus petits et, surtout, elle nota l'allongement de la membrane ondulante au cours des repiquages successifs.

Ainsi, pour cet auteur, la morphologie de *Trichomonas vaginalis* en culture devenait-elle difficile à distinguer de celle de *Trichomonas intestinalis*. Elle en déduisit que ces deux variétés de flagellés devaient être spécifiquement identiques, leurs différences morphologiques, *in vivo*, s'expliquant par des conditions de vie différentes (théorie uniciste).

Les observations d'ANDREWS diminuaient donc l'intérêt que l'on aurait pu porter à la membrane ondulante qui est considérée actuellement comme un important élément morphologique d'identification.

Pour cette raison, DE CARNERI et tout récemment CAVIER se sont efforcés de renouveler cette transformation.

Une souche de *Trichomonas vaginalis* ayant été mise en culture sur le milieu de TANABE et CHIBA, les parasites furent examinés après coloration par la méthode de ROMANOWSKI et par l'hématoxyline ferrique de HEIDENHAIN.

Aucun allongement de la membrane ne put être décelé, cette dernière restant, pour l'ensemble des flagellés, sensiblement égale à la moitié du corps.

Nous pouvons donc considérer, malgré la constatation d'ANDREWS, que la longueur de la membrane ondulante est un

caractère morphologique remarquablement stable, aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*.

L'origine d'un *Trichomonas* étant précisée, la détermination de la longueur de cette membrane constitue donc un élément d'identification complémentaire d'un grand intérêt.

C. — *Variation du nombre des flagelles d'une espèce déterminée :*

Certains auteurs ont signalé que des variations individuelles peuvent ramener le nombre des flagelles de *Trichomonas intestinalis* à 4 et même à 3. MANDOUL et Mlle PESTRE (56) ne pensent pas que ces variations puissent justifier la subdivision de l'espèce *Trichomonas intestinalis* et la création des genres *Pentatrichomonas*, *Tétratrichomonas* et *Tritrichomonas*.

A notre sens, le nombre des flagelles d'une espèce déterminée ne peut être considéré, à lui seul, comme un élément de caractérisation d'une valeur indiscutable. Nous avons fréquemment constaté qu'*in vitro* le passage des parasites sur certains milieux permet d'obtenir des formes pratiquement aflagellées, formes qui ont été décrites par divers auteurs.

Rappelons, à ce propos, les récents travaux d'INOKE (32) :

L'auteur, ayant fait passer *Trichomonas vaginalis* sur la souris, remarqua que les flagellés acquéraient la propriété de pousser facilement sur le bouillon appelé « F-bouillon » utilisé pour *Trichomonas foetus* et dans lequel *Trichomonas vaginalis* ne peut se multiplier.

L'hypothèse d'une variation ou d'une mutation semble renforcée par le fait que la morphologie de ces *Trichomonas* de passage se rapproche de celle de *Trichomonas foetus* ; c'est ainsi que l'auteur a remarqué, sur ces protozoaires, la diminution du nombre des flagelles (3 au lieu de 4), l'allongement de la membrane ondulante et la présence d'un flagelle postérieur libre qui n'avait pas été observé sur les flagellés d'origine.

Utilisant des tests d'immunologie, d'agglutination et de précipitation, l'auteur a pu montrer que les *Trichomonas vaginalis* de passage et les *Trichomonas foetus* avaient des antigènes communs, tout en conservant leur caractère originel individuel.

Ces quelques considérations montrent que l'origine d'un flagellé, la longueur de sa membrane ondulante et le nombre de ses flagelles constituent un faisceau d'éléments pouvant suffire à l'identification d'une espèce de *Trichomonas*, à la condition toutefois que les parasites se trouvent dans un milieu favorable sur lequel ils présentent une forme typique de *Trichomonas*.

Ajoutons que la détermination de la constitution chromosomique de ces protozoaires, si elle était réalisable par des méthodes

sûres et pratiques, devrait apporter un élément particulièrement intéressant pouvant être utilisé avec profit par les Parasitologues.

Les observations qui ont pu être faites montrent les difficultés de telles déterminations et expliquent les divergences des résultats déjà publiés.

III. — GÉNÉRALITÉS SUR LA BIOLOGIE DES TRICHOMONAS

1°) Reproduction des *Trichomonas* - Les formes polynucléées :

La reproduction des *Trichomonas* s'effectue par voie asexuée. Il y a étranglement, puis séparation du noyau et du protoplasme et formation de deux individus nouveaux.

Chez une forme végétative normale comportant un seul noyau, la division est simple, mais dans d'autres cas, plus rares, le protoplasme cellulaire peut contenir un nombre plus ou moins élevé de noyaux.

Ces formes polynucléées ont été rencontrées *in vivo* aussi bien qu'*in vitro* dans des conditions de vie défavorables.

Dès 1915, KOFOID et SWEZY (39) rapportent l'existence, chez différentes espèces de *Trichomonas*, de grandes cellules contenant jusqu'à huit noyaux.

Plus récemment, DYROFF et son élève MICHALZIK (57), de l'Université d'ERLANGEN, observèrent chez *Trichomonas vaginalis* la formation *in vivo* de ces formes plurinucléées.

Tout récemment enfin, au cours de recherches effectuées au Laboratoire de Parasitologie de cette Faculté, des formes polynucléées ayant de deux à huit noyaux ont été remarquées sur des cultures pures de *Trichomonas vaginalis* âgées de plusieurs jours. Des colorations par la méthode de MAY-GRÜNWARD, GIEMSA, effectuées sur les frottis, ont facilité l'examen des noyaux dont le nombre peut s'élever jusqu'à huit.

En aucun cas, les observateurs ne purent mettre en évidence une membrane kystique morphologiquement reconnaissable, mais la plupart admettent qu'il s'agit de formes de survie dans un milieu relativement défavorable ; elles conservent la faculté de divisions multiples lorsque les conditions extérieures redeviennent meilleures.

Ces éléments polynucléés sont des cellules géantes atteignant parfois 80 μ . On peut les considérer comme des formes de résistance mais non comme des formes kystiques au sens propre du mot.

SAMUEL (66) montra en 1954 qu'il était possible de produire *in vitro* de grandes quantités de ces cellules multinucléées par le simple procédé qui consiste à augmenter la tension d'oxygène.

Les cultures obtenues contiennent une très grande quantité de cellules géantes (50 à 80 %). Ces dernières, repiquées et mises à incuber sous pression réduite d'oxygène, produisent en 48 heures des cultures complètement normales et privées de formes géantes. D'après l'auteur, ce procédé, pour obtenir de telles cellules, à partir de *Trichomonas* normaux et inversement, peut être poursuivi indéfiniment.

2°) Les formes de résistance des *Trichomonas* :

Les fréquentes récidives observées au cours de la Trichomonase vaginale et la multiplicité des thérapeutiques expérimentées jusqu'à présent sans résultats définitifs constituent des arguments en faveur de *formes de résistance* qui, dans certains cas, pourraient expliquer la pathogénie de l'affection. BOCCI et DURANDO (4).

Si les auteurs classiques déclarent ne jamais avoir pu observer de kystes, beaucoup admettent l'existence de formes diverses immobiles et dépourvues de flagelles, formes auxquelles SOREL a donné le nom de *globules basophiles*.

Doit-on interpréter ces formes comme latentes et susceptibles de subsister en attendant des conditions extérieures plus favorables ?

LAPIERRE estime qu'il s'agit plutôt de formes de dégénérescence. Cependant, il faut admettre que la présence de *formes de résistance* dans les replis les plus profonds de la muqueuse vaginale pourrait expliquer les récidives de l'affection chez des femmes traitées et n'ayant eu aucune possibilité de réinfestation par contact sexuel.

Il semble donc que des formes de résistance soient à l'origine de certaines vaginites chroniques et rebelles à tous les traitements. BOCCI et DURANDO ont d'ailleurs fréquemment retrouvé, chez les femmes ayant de telles affections, ces mêmes éléments aflagellés.

Nous avons personnellement remarqué, qu'*in vitro*, *Trichomonas vaginalis* est susceptible, dans certaines conditions défavorables, de se transformer en formes dites *de résistance* que certains auteurs confondent avec les formes *de souffrance* dont nous avons déjà mentionné l'existence dans cet exposé et qui sont constituées par des individus arrondis, de tailles variées, granuleux, souvent aflagellés mais pouvant posséder une légère mobilité.

POWEL, en 1936 (61), les considère comme des pseudo-kystes ne pouvant redonner des formes végétatives par repiquage.

TRUSSEL (71) admet leur existence mais ne les a jamais remarquées sur des cultures pures.

Personnellement, c'est précisément sur des cultures pures de *Trichomonas vaginalis*, âgées parfois d'une quinzaine de jours et se développant en anaérobiose, que nous les avons rencontrées.

Ayant examiné les cultures à ce stade et n'ayant pas décelé de formes flagellées normales, nous avons repiqué ces éléments sur un milieu neuf identique, mais plus riche en sérum et additionné de facteurs de croissance. Nous avons ainsi obtenu, après un certain temps de latence, une culture particulièrement florissante de *Trichomonas* morphologiquement normaux.

Il convient d'ajouter, cependant, que l'étude approfondie de ces formes devrait comporter leur séparation par la technique de micromanipulation, ce qui permettrait d'exclure toute possibilité d'ensemencement de *formes de souffrance* encore mobiles et susceptibles de redonner une culture abondante.

Remarquons, enfin, que nous n'avons jamais observé de telles formes sur des cultures mixtes ou sur des cultures pures mixtes (*).

Dans ces cas, le passage des *formes de souffrance*, encore mobiles, aux formes de dégénérescence granuleuse semble se réaliser rapidement. Il est possible que les substances toxiques libérées par le métabolisme microbien dans le milieu de culture aient, à un certain moment, une action particulièrement nocive sur les protozoaires.

3°) Résistance des *Trichomonas* dans le milieu extérieur en fonction des variations de température :

La température du corps humain correspond à la température optimale pour la multiplication des *Trichomonas*.

In vitro, il convient de distinguer *Trichomonas vaginalis* des autres *Trichomonas* humains dont la résistance dans le milieu extérieur est différente.

Trichomonas vaginalis est fragile, la température de 37°C est nécessaire pour assurer son développement et surtout sa multiplication.

Cependant, une culture particulièrement florissante peut conserver une certaine vitalité après 24 heures à 20°C, c'est-à-dire à la température du laboratoire.

Placé sur une cellule de NAGEOTTE, en suspension dans du sérum physiologique, *Trichomonas vaginalis* peut conserver sa mobilité à 20°C pendant environ six heures et à 37°C pendant au moins dix heures.

(*) Dans la culture pure mixte, les flagellés, isolés au préalable en cultures pures, sont associées à un seul germe judicieusement choisi.

D'après TRUSSEL (70), une culture pure de *Trichomonas vaginalis* pourrait survivre treize jours à la température ordinaire ; il estime d'ailleurs que le flagellé ne peut se multiplier dans ces conditions.

Les autres *Trichomonas* humains, *Trichomonas tenax* et *Trichomonas intestinalis* sont peu fragiles et se développent facilement à la température de 20°C ; il en est de même pour *Trichomonas parva*, parasite des rongeurs, dont la vitalité est considérable.

4°) Rôle du pH :

Le pH vaginal normal est voisin de 4, mais le pH vaginal le plus favorable au développement du flagellé varie entre 5 et 6. On explique cette diminution d'acidité locale par une augmentation de la flore bactérienne et par la disparition du bacille de DOEDERLEIN, ferment lactique qui assure le maintien du pH vaginal normal.

Le pH des différents milieux proposés pour l'entretien des *Trichomonas* varie entre 5,5 et 7.

Les milieux destinés à la culture des parasites associés à leur flore bactérienne sont en général ajustés à pH 7 ; après l'ensemencement, on constate une altération assez rapide du pH qui diminue pour se maintenir, après 48 heures, aux environs de 6.

Les substances produites par le métabolisme microbien et parasitaire sont à l'origine de cette diminution du pH qui ne semble pas être un inconvénient pour le développement des flagellés.

Les milieux destinés à la culture pure des *Trichomonas* sont ajustés à un pH de 5 environ, ce pH subit peu de modifications, après l'ensemencement, par suite de l'absence de flore associée.

5°) Influence de l'anaérobiose sur le développement des *Trichomonas* :

JOHNSON, dès 1942 (36), puis MAGARA, AMINO et YOKOUTI (55) en 1953, insistent sur l'intérêt de la culture de *Trichomonas vaginalis* en anaérobiose et proposent des méthodes pour y parvenir.

L'effet favorable de l'anaérobiose sur le développement de ces flagellés a été mis à profit par de nombreux chercheurs pour les séparer complètement de leur flore associée qui est composée de germes aérobies, pour la plupart.

L'élimination des microbes est réalisée rapidement par l'action conjointe de l'anaérobiose et par l'utilisation de substances antibiotiques judicieusement choisies.

Nous décrirons plus loin les différentes techniques utilisées pour obtenir cette anaérobiose, dont l'emploi nous paraît indispensable pour parvenir à la purification totale des souches.

IV. — ÉPIDÉMIOLOGIE - PATHOGÉNIE ET SYMPTOMATOLOGIE DE LA TRICHOMONASE

1°) Epidémiologie :

Nous avons déjà insisté sur la fréquence de la Trichomonase uro-génitale aussi bien chez l'homme que chez la femme. Cette affection est, de loin, la plus répandue des maladies vénériennes. Son mode normal de transmission est le contact sexuel, les deux partenaires se trouvant également atteints.

KAMIL KÜCERA, de Prague (40), a récemment mis en évidence, dans une importante étude statistique, l'influence dominante de la transmission vénérienne dans l'infestation à *Trichomonas*. Il ressort de ses travaux que les personnes exposées à des changements de partenaires sont les plus fréquemment atteintes.

L'autoréinfestation chez la femme peut s'expliquer par la présence de *formes de résistance* dans l'urètre ou dans les replis de la muqueuse vaginale — enfin, certains cas très rares peuvent être causés par des infestations extra-vénériennes.

Divers auteurs ont cité des cas de transmission par les objets de toilette ou le linge personnel. Ces modes de contamination sont possibles, le parasite pouvant survivre pendant une courte durée sur un support légèrement humide. De toute façon, l'intervalle entre le départ de la source d'infestation et le contact avec la personne saine doit être très court. Quant à la contamination accidentelle par l'eau des piscines ou le siège des cabinets, elle apparaît négligeable, comme l'ont montré récemment CHAPPAZ, BERTRAND et FREAL (15).

2°) Pathogénie :

Si le caractère pathogène de *Trichomonas vaginalis* n'est plus mis en doute, il convient de faire remarquer qu'il est capable, chez certains sujets, de déclencher des manifestations cliniques importantes alors que chez d'autres il se comporte comme un simple saprozoïte.

Il apparaît donc que certains facteurs puissent jouer un rôle déterminant pour modifier ce pouvoir pathogène ; parmi eux citons : l'imprégnation vaginale en œstrogènes et en glyco-gène, l'acidité locale, la composition de la flore associée et sa richesse en bacilles de DOEDERLEIN.

Si l'imprégnation vaginale en œstrogènes est élevée, la muqueuse est épaisse et riche en glycogène. Sous l'influence d'une diastase hydrolysante, le glycogène libère du glucose et du maltose dont la fermentation donne naissance à de l'acide lactique qui provoque un important abaissement du pH. C'est précisément à partir de ces sucres et dans ces conditions d'acidité locale que se développe le bacille de DOEDERLEIN, témoin constant d'un état vaginal normal.

L'infestation à *Trichomonas* est extrêmement rare avant la puberté, ce qui laisse penser que cette affection n'apparaît pas lorsque l'activité hormonale est nulle.

CHAPPAZ (13) et CHATELLIER estiment que l'hypofolliculinémie est un des facteurs déterminants de la prolifération des parasites au niveau des voies génitales de la femme. Cette carence en folliculine s'accompagne d'une atrophie de l'épithélium vaginal et réduit sa richesse en glycogène. Il s'ensuit une diminution du nombre des bacilles de DOEDERLEIN et une augmentation du pH du milieu, ce qui est favorable au développement d'une flore plus variée et abondante.

3°) Symptomatologie :

a) Chez la femme :

FILHO (26) pense qu'il n'existe pas de tableau clinique de la vaginite à *Trichomonas*.

Certaines formes sont typiques, elles ont été décrites par HOEHNE ; ce sont des formes spécifiques (formes aiguës de PEREZ). D'autres cas sont accompagnés de signes cliniques de faible importance ; ce sont des formes frustes (formes subaiguës ou chroniques de PEREZ).

Nous décrirons rapidement les principaux symptômes qui accompagnent les formes typiques de vaginites à *Trichomonas*.

Le symptôme le plus constant est la leucorrhée. Elle est franchement purulente dans les cas aigus, abondante, fluide, à odeur âcre. Dans les cas chroniques, elle peut être très discrète. C'est ainsi que nous avons rencontré des femmes abondamment parasitées ne présentant aucune leucorrhée apparente et ne souffrant d'aucun prurit. Des troubles du cycle menstruel avaient incité le Médecin à les diriger vers le Laboratoire.

Le prurit vulvaire est également un symptôme très constant dans les formes aiguës et subaiguës ; il est diurne et nocturne, parfois très intense, facteur de lésions locales.

La dyspareunie d'intromission est plus ou moins accentuée ; elle est expliquée par les lésions vulvaires : intertrigo, œdème des petites et grandes lèvres causé par la flore associée et par les lésions vaginales : muqueuse rouge et parsemée d'un piqueté ecchymotique.

D'autres troubles sont moins constants. Tels sont : les métrites et les irrégularités menstruelles. Il en est de même des symptômes généraux comme les troubles nerveux, l'anorexie et l'amaigrissement que peuvent présenter certaines patientes.

Ajoutons que le tractus urinaire de la femme est très souvent parasité. Il est peut-être à l'origine de nombreuses réinfestations vaginales. WHITTINGTON (76) pense que cette réinfestation permet d'expliquer les récives fréquentes chez les sujets soumis à un traitement vaginal local. On comprend l'intérêt de l'utilisation, dans la Trichomonase uro-génitale, d'un médicament spécifique capable d'être éliminé par le rein et véhiculé par les voies urinaires.

b) Chez l'Homme :

La Trichomonase urétrale de l'homme est très fréquente et, comme nous l'avons dit, difficile à mettre en évidence, les symptômes pouvant être absents.

Les flagellés sont localisés au niveau de la prostate et des vésicules séminales et, seule la répétition des examens de la sécrétion urétrale et de la sécrétion prostatique permet de déceler la présence des parasites. CHAPPAZ (14).

L'urétrite à Trichomonas a parfois l'allure d'une urétrite gonococcique ; elle se manifeste par un écoulement purulent accompagné de douleurs à la miction. Rapidement, l'affection passe à la chronicité et l'écoulement devient insignifiant du type *goutte matinale*. Ce stade a une forme récurrente avec des récives causées par les réinfestations sexuelles. (Trichomonase conjugale).

ÉTUDE DE LA FLORE ASSOCIÉE A TRICHOMONAS VAGINALIS

IMPORTANCE DU RÔLE JOUÉ PAR CETTE FLORE IN VIVO ET IN VITRO

Dans un premier chapitre, nous décrirons la flore vaginale au niveau du vagin normal et parasité et nous définirons son rôle *in vivo*.

Dans un second chapitre, nous étudierons le rôle joué par cette flore *in vitro*. Nous serons ainsi amené à préciser l'action de certains germes sur la croissance et la multiplication des Trichomonas cultivés sur différents milieux.

I. — LA FLORE AU NIVEAU DU VAGIN NORMAL ET PARASITÉ SON RÔLE IN VIVO

1°) Généralités :

Avant 1935, de nombreux gynécologues ne considéraient pas *Trichomonas vaginalis* comme l'agent pathogène exclusif des vaginites à Trichomonas. On estimait alors que la flore associée au parasite était en grande partie responsable des manifestations cliniques de la Trichomonase.

La réussite des essais d'infestation de la femme avec des souches pures de *Trichomonas vaginalis* a prouvé que le flagellé possédait un rôle pathogène qui lui était propre. TRUSSEL et PLASS (73).

Cependant, il reste admis par tous que la flore plurimicrobienne et mycosique, qui accompagne *in vivo* le flagellé, joue un rôle important dans le développement et la ténacité de l'affection.

De nombreux auteurs ont proposé une classification des germes accompagnant le protozoaire ; nous retiendrons celle de SCHROEDER

qui distingue trois degrés de pureté bactériologique en fonction de la nature et de l'importance de la flore vaginale. TRUSSEL (72).

Il convient maintenant d'apporter une réponse aux questions suivantes : comment expliquer l'importance de la flore associée dans la Trichomonase ? Quelle est sa nature ? Quel rôle exact joue-t-elle ?

Nous allons brièvement faire le point sur ces différentes questions.

2°) La flore du vagin normal - Degré I de Schroeder :

Elle est constituée presque exclusivement par un ferment lactique : le bacille de DOEDERLEIN, bacille gram +, immobile et aérobic facultatif. Morphologiquement, c'est un bâtonnet mince, de 4 à 5 μ de long, polymorphe, parfois coccobacillaire.

Comme nous l'avons déjà dit précédemment, pour une imprégnation folliculinique normale, la muqueuse vaginale exfolie des cellules riches en glycogène, qui, par hydrolyse diastasique libère du maltose et du glucose. Le bacille vit aux dépens de ces sucres qu'il fait fermenter avec production d'acide lactique, d'où abaissement du pH local aux environs de 4,5.

Certains auteurs, dont CHAPPAZ, attribuent également au bacille de DOEDERLEIN une certaine action antibiotique qui contribue à expliquer la pureté de la flore du type I. On l'a signalé parfois associé à *Candida albicans*.

3°) Flore du type II de Schroeder,

Etiologie des vaginites microbiennes :

La flore du type II est variée et abondante, on y rencontre des cocci Gram +, germes pyogènes, comme le staphylocoque, le streptocoque, l'entérocoque ou des bacilles Gram négatif, comme le colibacille ou le bacille pseudo-diphthérique.

On y trouve aussi parfois des germes anaérobies, des champignons lévuriformes et un bacille particulier : *l'hémophilus vaginalis*. Quant au bacille de DOEDERLEIN, il tend alors à disparaître.

Il semble que la principale cause de l'apparition de cette flore soit la diminution du taux des œstrogènes dont la conséquence est l'appauvrissement du vagin en glycogène et par suite la disparition progressive du bacille de DOEDERLEIN et l'alcalinisation locale.

Cette élévation du pH entre 5 et 6 va favoriser la prolifération des germes dont le développement était jusqu'alors inhibé par la présence de l'acide lactique et la concurrence de la flore vaginale normale.

Les vaginites microbiennes sont fréquentes chez la petite fille et la femme ménopausée, précisément à cause de l'hypo-œstrogénie qui caractérise ces deux périodes de la vie génitale. Ces vaginites se manifestent presque toujours par de la leucorrhée, du prurit et des douleurs pelviennes.

4°) Flore du type III de Schroeder :

C'est celle qui accompagne presque toujours *Trichomonas vaginalis*. Elle correspond à la flore du type II, mais plus abondante encore.

Le bacille de DOEDERLEIN a, cette fois, complètement disparu et l'alcalinité locale a encore augmenté pour se maintenir autour de pH 6, qui semble très favorable au développement des flagellés *in vivo*.

Les parasites sont alors souvent accompagnés d'un germe Gram négatif : *micrococcus gazogenes alcalescens* favorisant l'alcalinisation et qui est à l'origine des bulles gazeuses caractérisant la sécrétion dans ces vaginites (pertes mousseuses).

On est donc en droit de penser que cette flore joue un rôle d'agent primaire en modifiant le terrain avec changement du pH dans le sens où le *Trichomonas* se multiplie le plus facilement. Selon sa composition, elle peut aggraver plus ou moins le tableau clinique en augmentant le nombre des leucocytes qui confèrent aux sécrétions leur caractère purulent.

Y a-t-il, parmi cette flore, des germes susceptibles de favoriser tout particulièrement le développement du flagellé ?

Dans la majorité des cas, les bactéries associées sont nombreuses et variées, et il ne semble pas qu'un germe défini présente *in vivo* une affinité particulière pour le flagellé. Cependant, LUTZ (48) souligne la fréquence de l'association *Trichomonas vaginalis* + *Hémophilus vaginalis* parfois à l'état presque pur.

Il explique cette symbiose par le fait que ces deux micro-organismes végètent dans les meilleures conditions à pH 5,5. Il semble que cette association favorise l'aggravation de l'affection, les vaginites spécifiques à *Hémophilus* étant peu purulentes, alors que la vaginite mixte l'est beaucoup.

L'association *Trichomonas vaginalis* + *Gonocoque* est plus rare, elle a été décrite par de nombreux auteurs et nous l'avons personnellement rencontrée. Cependant, il ne s'agit pas là, à

notre avis, d'une symbiose, les deux microorganismes se développant concurremment et chacun pouvant être responsable des manifestations cliniques observées.

Nous pouvons donc considérer comme acquis les points suivants :

a) Le rôle pathogène certain de *Trichomonas vaginalis*.

b) Le rôle joué par la flore associée dans son ensemble.

Par suite de l'élévation du pH, la flore du type III rencontrée dans la Trichomonase favorise la pullulation des flagellés et détermine l'aggravation de l'affection (augmentation de la purulence des sécrétions, augmentation du prurit, apparition d'intertrigo et de lésions de grattage vulvaire).

c) Il ne semble pas, *a priori*, qu'un germe particulier de la flore puisse être rendu responsable de la croissance des flagellés, si l'on excepte l'association *Trichomonas vaginalis* + *Hémophilus vaginalis* décrite par LUTZ.

Seule, une étude quantitative et qualitative de ces germes associés pourrait permettre de définir le rôle respectif et possible des divers éléments en présence et apporter au Clinicien des renseignements dont l'intérêt, sur le plan de la thérapeutique, ne peut échapper.

Dans le cadre de cette étude pourraient figurer des infestations expérimentales de la femme avec des cultures pures mixtes du parasite, cultures facilement réalisables *in vitro*, comme nous le verrons dans la suite de cet exposé. Il ne semble pas, cependant, que nos habitudes occidentales autorisent de telles expériences couramment pratiquées en Extrême-Orient.

II. — INFLUENCE DE LA FLORE ASSOCIÉE SUR LA CROISSANCE DE TRICHOMONAS VAGINALIS IN VITRO

1°) Généralités :

Nous venons de voir combien il était difficile de définir la part jouée *in vivo* par chacun des germes associés aux flagellés. Dans les conditions actuelles, seule peut être précisée avec certitude l'influence de la flore vaginale dans son ensemble.

L'étude de cette flore *in vitro* va permettre de mettre en lumière les influences favorables ou non de tels ou tels germes sur la croissance des protozoaires.

Cette étude revêt un intérêt particulier dans le cadre de nos recherches ; en effet, la floreensemencée en bloc sur un milieu de culture en même temps que les flagellés se développera dans des conditions différentes de celles qui étaient réunies au niveau du vagin.

Certains germes prendront le pas sur d'autres, mais s'il s'agit d'espèces favorisantes, pourront faciliter l'obtention de cultures florissantes.

On conçoit que des essais réalisés sur des souches, ainsi placées dans des conditions particulières, soient susceptibles de donner des résultats différents de ceux obtenus initialement ; de plus, les variations quantitatives de la flore peuvent avoir une influence sur la vitalité des flagellés, ce qui obligera le Parasitologue à limiter le développement des germes par l'usage des antibiotiques.

Enfin, notons que l'équilibre *Trichomonas vaginalis* $\rightleftharpoons$ flore associée est également soumis à l'influence de la composition des milieux de culture ; en effet, la plupart des milieux actuellement utilisés, pour l'entretien et pour les tests, ne permettent la croissance des *Trichomonas* qu'associés, soit à la flore d'accompagnement initiale, soit à des germes judicieusement choisis.

On comprend alors qu'il soit nécessaire d'apporter quelques précisions sur le rôle joué *in vitro* par les éléments de cette flore et par les produits du métabolisme microbien.

2°) Technique d'étude utilisée :

a) *Le principe en est le suivant* : on réalise une culture pure de *Trichomonas vaginalis* sur un milieu approprié. On repique alors les flagellés sur un milieu différent où ils ne peuvent se développer sans bactéries. Ce milieu est ensuiteensemencé avec le germe dont on veut étudier l'influence sur le parasite.

b) *Les milieux proposés* pour l'entretien de *Trichomonas vaginalis* à l'état pur varient suivant les auteurs.

KEIZO ASAMI, de Tokyo (3), propose un milieu à base de cystéine et de sérum.

Personnellement, nous avons utilisé le milieu de MAGARA qui permet d'obtenir assez rapidement une culture rigoureusement pure comme l'ont prouvé les subcultures de contrôle bactériologique restées négatives.

KEIZO ASAMI repique ensuite le flagellé sur le milieu de TANABE CHIBA (agar additionné d'asparagine, de sérum et de RINGER) et y associe un germe choisi.

On peut également employer, comme nous l'avons fait, le milieu N de l'Institut Pasteur sur lequel le protozoaire ne peut se

développer à l'état pur, mais qui permet d'obtenir facilement des cultures pures mixtes.

c) *Les bactéries employées* sont isolées de vagins humains.

D'après leurs effets sur la croissance de *Trichomonas vaginalis*, nous proposons de les classer en trois groupes :

- *groupes des espèces favorisantes*,
- *groupes des espèces indifférentes*,
- *groupe des espèces nuisibles* à la croissance des flagellés.

GROUPE DES ESPÈCES FAVORISANTES :

KEIZO ASAMI (2) considère qu'une espèce favorable à la croissance de *Trichomonas vaginalis* permet l'entretien des cultures jusqu'à la dixième subculture et plus. Par ailleurs, il constate que la multiplication des flagellés diminue au fur et à mesure des ensemencements.

Parmi les espèces favorisantes les plus courantes, citons :

— *Staphylococcus citreus*, *aureus*, *epidermitis* et *viridans* qui favorisent nettement la culture des *Trichomonas*.

— *Bacillus subtilis*, fréquemment rencontré, a une influence plutôt favorable sur la croissance des parasites ; en effet, des cultures de protozoaires fortement souillées par ce germe ne semblent pas devoir en subir d'inconvénients.

Certains auteurs, toutefois, estiment avec PRAY (62) que *Bacillus subtilis* possède un effet inhibiteur modéré sur la multiplication des flagellés, mais abaisse toujours la durée de vie des cultures. Ce n'est pas le cas général à notre avis ; en effet, nous avons entretenu pendant plusieurs mois des souches florissantes de *Trichomonas* abondamment souillées par *Bacillus subtilis*.

— Nous citerons ensuite *Escherichia coli* que nous pouvons considérer comme une espèce favorisante, ce germe nous ayant permis l'entretien d'une souche de *Trichomonas vaginalis*, très vivace, pendant près d'un an.

DE CARNERI (19) avait également obtenu sans difficulté des cultures pures mixtes de *Trichomonas vaginalis* associé à *Escherichia coli* sur milieu C.P.L.M. de JOHNSON et TRUSSEL.

Cette association aurait donné une telle vigueur au parasite, qu'il n'effectuait les repiquages que tous les quinze jours seulement.

A l'encontre de ces opinions, KEIZO ASAMI classe le colibacille parmi les espèces indifférentes et PRAY pense même qu'il écourte beaucoup la multiplication des flagellés et la vie des cultures.

- Mentionnons enfin, parmi les espèces considérées par divers auteurs comme favorisantes : *Lactobacillus acidophilus* et *Pseudomonas fluorescens*.

GROUPE DES ESPÈCES INDIFFÉRENTES :

- *Staphylococcus albus* est considéré par beaucoup d'auteurs comme le représentant de ce groupe. Notons, toutefois, que ce germe nous a permis d'entretenir les protozoaires sur le milieu N de l'Institut Pasteur pendant une durée de neuf mois.
- *Streptococcus viridans*, *pharyngis* et *hæmolyticus* sont peu favorables à la croissance de *Trichomonas vaginalis* ; il en est de même de *Proteus vulgaris* et de *Pseudomonas æruginosa*.
- Quant au *Bacille de Doederlein*, il semble devoir présenter moins d'intérêt *in vitro* qu'*in vivo* et on le classe ici parmi les espèces indifférentes.

GROUPE DES ESPÈCES NUISIBLES :

- Pour KEIZO ASAMI, le *Champignon Candida* fréquemment rencontré *in vivo* associé au flagellé, n'est pas, *in vitro*, particulièrement favorable à sa prolifération. Pourtant, SOREL, utilisant un milieu simple permettant le développement rapide de *Candida Albicans*, a montré que *Trichomonas vaginalis* s'installe en culture aérobie en compagnie de ce champignon lévuriforme et insiste sur le fait qu'il est même possible d'espacer les repiquages (68).
- Enfin, il faut mentionner que certains germes anaérobies sont considérés par différents Parasitologues comme nuisibles à la croissance des Trichomonas. Ils écourteraient la multiplication des flagellés et la vie des cultures.

Comme on le voit, les résultats obtenus par les expérimentateurs sont loin d'être concordants et cette tentative de classification des germes de la flore vaginale en fonction de leur action sur le parasite ne peut être, dans l'état actuel des faits, considérée comme définitive.

De plus, les études *in vitro* ne fournissent pas toujours des résultats similaires à ceux obtenus *in vivo* ; enfin, il faut tenir compte de l'action sur les flagellés des produits du métabolisme microbien.

Effets des produits du métabolisme microbien sur la croissance de Trichomonas vaginalis :

Divers Parasitologues ont remarqué, avec LASH (46), que les filtrats de bactéries produisent un effet tout à fait semblable aux cultures totales de bactéries sur le flagellé.

L'accumulation des déchets métaboliques dans le milieu de culture diminue la croissance des flagellés, mais il suffit d'ajouter un peu de sérum frais pour provoquer une stimulation de la culture moribonde, ce qui peut être attribué à la présence de substances nutritives additionnelles.

Quant à l'altération du pH, conséquence directe de l'accumulation de ces déchets, il ne semble pas qu'elle puisse gêner le développement des protozoaires, tout au moins dans certaines limites et surtout dans la zone alcaline.

Nous avons déjà signalé ce fait et nous aurons l'occasion d'y revenir dans la suite de cet exposé.

LES MILIEUX DE CULTURE UTILISÉS POUR L'ENTRETIEN DES TRICHOMONAS ET POUR LES ESSAIS IN VITRO

I. — GÉNÉRALITÉS

Le but poursuivi dans ce travail étant la mise au point de tests *in vitro* destinés à déterminer l'activité trichomonacide de différentes substances vis-à-vis d'une culture de flagellés, il s'avère indispensable d'asseoir ces tests sur des bases solides et rationnelles qui permettront l'obtention de résultats reproductibles et valables.

Si le Clinicien se contente, pour son diagnostic, d'implanter un flagellé sur un milieu de culture sans se soucier de la conservation de la souche, il en va différemment pour le Parasitologue qui cherche essentiellement à obtenir une culture stable et durable sur laquelle pourront alors être effectuées les expériences.

La standardisation de la souche est fonction de deux facteurs importants qui sont :

- la nature et l'abondance de la flore associée ;
- la composition du milieu de culture et la technique employée.

1°) Nature et abondance de la flore associée :

Nous avons montré, dans le précédent chapitre, que cette flore microbienne possède une activité encore mal définie, certains germes convenant mieux que d'autres à la prolifération des parasites *in vitro*.

La présence de la flore *in vitro* peut être considérée à la fois comme un élément pouvant favoriser l'obtention d'une souche vivace et comme un élément perturbateur risquant de modifier sa stabilité.

La présence des microorganismes ne constitue pas obligatoirement un facteur à éliminer des cultures de *Trichomonas*, cette flore étant souvent indispensable à l'entretien des souches sur les milieux classiques ; c'est ainsi qu'elle augmente la vitalité des flagellés et favorise leur multiplication, ce qui permet d'espacer les délais de repiquage.

Ajoutons que le parasite accompagné de sa flore d'origine se trouve dans des conditions assez voisines de celles qui sont réalisées dans le milieu vaginal.

Tous ces avantages, inhérents à la présence de la flore, ont amené la plupart des Biologistes à pratiquer leurs essais d'activité trichomonacide sur des cultures mixtes ; les résultats obtenus étant approximatifs mais suffisants.

Cependant, il n'échappe à personne que des souches ainsi entretenues ne peuvent être considérées comme *standardisées* et qu'il est nécessaire de limiter le plus possible le développement microbien.

C'est pourquoi la plupart des auteurs préconisent l'emploi de diverses substances antibiotiques (pénicilline, streptomycine, etc.), qui, sans nuire à la multiplication des flagellés, évitent une prolifération trop rapide des germes associés.

Cette diminution quantitative de la flore ne permet pas toutefois de sélectionner les différents germes en présence, aussi a-t-on été amené à préconiser l'emploi de cultures pures mixtes où le parasite est associé à un seul germe judicieusement choisi dont le rôle est de favoriser la croissance des *Trichomonas* sur les milieux classiques.

Enfin, certains Biologistes estiment actuellement que seule la culture sur milieux spéciaux est susceptible de stabiliser la souche, condition indispensable à la mise au point d'essais d'activité trichomonacide précis et reproductibles.

2°) Composition du milieu de culture et technique employée :

Parallèlement au problème de la limitation de la flore va se poser celui du choix du milieu de culture qui peut être différent suivant le but que l'on se propose.

L'entretien indéfini d'une souche de flagellés n'exige pas l'utilisation de milieux spéciaux. On choisira à cet effet des milieux permettant d'obtenir une abondante culture bien vivace et dont les repiquages n'auront pas à être effectués trop fréquemment.

On ne cherchera à limiter la flore associée que pour éviter une prolifération microbienne trop intense nuisible à la croissance des parasites,

Les milieux les plus divers et les plus complexes ont été proposés pour l'entretien des souches de *Trichomonas* et le milieu N de l'Institut Pasteur est, parmi eux, le plus utilisé en France.

Cependant, l'intérêt principal de l'entretien des souches reste de fournir aux Biologistes du matériel vivant disponible à n'importe quel moment pour les essais de substances trichomonacides *in vitro* ou *in vivo*.

Aussi, les expérimentateurs préféreront-ils des milieux simples, bien standardisés et dont les composants gêneront le moins possible l'action de la substance à essayer. Ils choisiront ceux qui, répondant à ces conditions, favorisent une prolifération intense des flagellés.

De tels milieux devront permettre, en outre, l'entretien de souches à l'état pur.

Nous décrirons dans ce chapitre quelques milieux permettant de réaliser ces conditions ainsi que les techniques utilisées par les auteurs.

Nous commencerons donc cette étude par une description sommaire des principaux milieux diphasiques d'usage courant qui comportent une phase liquide et une phase solide. Ils sont utilisés en France aussi bien pour l'entretien des souches que pour les essais *in vitro*. Ils ne permettent pas, en général, l'obtention de souches amicrobiennes.

L'étude des milieux monophasiques, ne comportant qu'une phase liquide, est beaucoup plus vaste. Nous nous attacherons surtout à la description de ceux qui présentent un réel intérêt, soit pour l'entretien des souches, soit pour les essais en tubes.

II. — IMPORTANCE DU SÉRUM SANGUIN POUR LA CULTURE DES TRICHOMONAS IN VITRO

Avant d'aborder l'étude des milieux de culture, il importe de souligner, tout particulièrement, le rôle primordial joué par le sérum sanguin, élément constitutif indispensable de tous les milieux utilisés.

Les Biologistes sont unanimes pour considérer cet élément comme nécessaire à la survie et au développement des flagellés.

JOHNSON (36), dès 1942, estimait que le pourcentage de sérum devait être compris entre 3 et 15 % pour permettre la multiplication des *Trichomonas*, les subcultures étant négatives en dessous de 3 %.

Ce chiffre peut être abaissé d'ailleurs jusqu'à 1 % ; en effet, il nous a été possible d'entretenir, avec cette concentration de sérum, une souche pure de *Trichomonas vaginalis* sur le milieu de MAGARA. Cependant, pour un taux aussi faible, les parasites deviennent particulièrement sensibles à l'action des substances antiseptiques.

DE CARNERI (20), à la suite d'expériences réalisées avec des flagellés mis en culture sur le milieu au thioglycollate de Difco, montre que la présence de 3 % de sérum est nécessaire pour obtenir une concentration de un million de *Trichomonas vaginalis* par ml de culture.

Il faudrait 10 % de sérum pour que *Trichomonas intestinalis* se développe dans les mêmes conditions.

Le sérum sanguin contient donc des éléments constitutifs dont la présence est indispensable à la permanence des cultures.

SPRINCE et KUPFERBERG (69) ont tenté, en 1947, d'identifier ce facteur inconnu. Ils ont utilisé un milieu complexe dérivé du milieu C.P.L.M. de JOHNSON et TRUSSEL où la peptone Difco est remplacée par le *Trypticase*, produit de digestion pancréatique de la caséine. Ils y ajoutent un complexe vitaminique B, du sérum dilué au demi dans une solution de RINGER, et de nombreuses autres substances.

Ces auteurs ont alors séparé une fraction de sérum sanguin éthéro-soluble et une fraction éthéro-insoluble dont la présence simultanée s'est montrée obligatoire.

- Dans la fraction éthéro-soluble, ni le cholestérol, ni l'estradiol n'ont d'activité essentielle ; par contre, les acides gras et, en particulier, l'acide linoléique et un facteur peu connu dialysable et thermostable ont une influence favorable sur la croissance des flagellés.
- Dans la fraction éthéro-insoluble ou hydro-soluble, ils ont remarqué le rôle important joué par la sérum-albumine, mais n'ont pu affirmer que ce constituant fût le seul indispensable.

On voit donc que les facteurs nécessaires à la croissance *in vitro* de *Trichomonas vaginalis* sont répartis dans les deux fractions hydro-soluble et hydro-insoluble du sérum sanguin.

De nombreux sérums humains ou animaux ont été proposés. Doit-on accorder une préférence aux sérums humains ? Certains auteurs le pensent, mais il est difficile d'en apporter la preuve. Nous avons personnellement toujours obtenu un bon développement des flagellés en utilisant du sérum de cheval ou du sérum de poulain. Aucune réponse définitive n'a pu être apportée à ce sujet pour le moment.

En simplifiant leur milieu, SPRINCE, JOHNSON et KUPFERBERG montrèrent aussi que certaines substances jouaient le rôle de facteurs indispensables ; tels sont : l'acide pantothénique et les ions phosphate ; par contre, ne sont pas nécessaires : la plupart des vitamines du groupe B, les bases puriques, les ions acétate et bicarbonate. Dans tous les cas, le sérum sanguin est indispensable à une concentration minimum de 0,03 %.

Nous avons été amené au cours de ces travaux à refaire quelques-uns des essais effectués par ces auteurs. Nous avons utilisé, soit le milieu américain C.P.L.M., soit le milieu de MAGARA dont la formule simple est particulièrement séduisante et qui permet le développement des flagellés à l'état pur. Notre étude a porté principalement sur le rôle joué par l'acide pantothénique à différentes concentrations sur la croissance des parasites.

Ensemencant des milieux contenant des concentrations croissantes d'acide pantothénique, nous n'avons pas observé d'augmentation très sensible du nombre des flagellés dans les tubes contenant les taux les plus élevés de cette substance.

Il semble donc que l'acide pantothénique joue un rôle plus qualitatif que quantitatif.

III. — ÉTUDE DES PRINCIPAUX MILEUX DIPHASIQUES UTILISÉS POUR LA CULTURE DES TRICHOMONAS

C'est LYNCH, en 1915, qui réalisa la première culture de *Trichomonas vaginalis* ; par la suite, de nombreux milieux destinés à la culture des amibes furent utilisés pour cultiver les Trichomonas. Parmi ceux qui permettent la prolifération des flagellés associés à d'autres germes, citons le milieu diphasique de BOECK et DRBOHLAV mis au point en 1925 et destiné à l'origine à la culture des amibes. Il fut modifié par DOBBEL et LAIDLAW en 1926 et présenté par DESCHIENS et LAMY en 1953 sous sa forme actuelle (42).

C'est le milieu diphasique le plus utilisé en France, on l'appelle aussi communément : milieu N de l'Institut Pasteur.

MILIEU N DE L'INSTITUT PASTEUR :

Il comporte une phase solide constituée par du sérum de cheval stérilisé par filtration sur bougie de CHAMBERLAND ou plaque filtrante. Après vérification de la stérilité, ce sérum est réparti dans des tubes stériles à raison de 2 ml par tube et coagulé en position inclinée.

La phase liquide comprend :

— solution de RINGER	95 ml
— solution de CO_3HNa à 0,1 % stérile	5 ml
— sérum stérile de cheval ou de poulain	15 ml
— amidon de riz stérile	1 g

Cette phase liquide est répartie à raison de 5 ml par tube de culture contenant déjà du sérum coagulé en position inclinée.

La stérilité du milieu terminé est contrôlée par passage à l'étuve à 37°C pendant 24 à 48 heures. Les tubes sont ensuite conservés au réfrigérateur à + 4°C.

L'ensemencement est fait dans les conditions bactériologiques à l'aide d'une pipette Pasteur stérile en laissant tomber à la surface du milieu neuf une ou deux gouttes d'une suspension de *Trichomonas* prélevée au fond d'un tube de culture âgée de 2 à 3 jours.

Pour un diagnostic de *Trichomonase* vaginale, on agite à la surface d'un milieu neuf l'écouvillon ayant servi au prélèvement pratiqué.

Cette méthode est principalement utilisée pour la recherche des flagellés, chez l'homme, dans un prélèvement urétral ou spermatique où ils passent souvent inaperçus à l'examen direct.

Sur ce milieu, on peut entretenir le parasite à 37°C en compagnie de sa flore associée d'origine en effectuant les repiquages tous les quatre à six jours. On doit éviter au cours des ensemencements toute souillure microbienne surajoutée, la flore d'origine étant malgré sa richesse bien définie qualitativement.

Le milieu N de l'Institut Pasteur donne entière satisfaction pour l'entretien des souches de flagellés ; toutefois, il offre certains inconvénients. Citons entre autres : la longueur et la multiplicité des opérations mises en œuvre pour sa préparation, et par voie de conséquence, l'augmentation des risques de souillures du milieu.

Pour les laboratoires qui utilisent accidentellement ce milieu dans un but de diagnostic, la solution la plus simple est d'utiliser les éléments fournis par l'Institut Pasteur pour sa confection ; il en va différemment lorsque le milieu est destiné à entretenir des souches pendant une longue durée. L'expérience que nous avons acquise dans ce domaine nous permet d'assurer qu'il est difficile d'acclimater une souche sur le milieu fourni par l'Institut Pasteur ; nous avons même observé le déclin rapide d'une souche très vivace de *Trichomonas vaginalis* que nous avons cherché à entretenir sur ce milieu.

SAVEL avait déjà signalé ce fait en 1957 (67) et préconisé l'emploi de milieux « maison » pour l'entretien des souches ou pour les essais *in vitro*.

Ces considérations nous font conseiller aux chercheurs de fabriquer eux-mêmes leur milieu N ; les résultats sont alors excellents, le lancement des souches s'effectue sans grande difficulté et leur conservation est assurée pour plusieurs années si on le désire.

Enfin, il faut ajouter que le prix de revient des tubes utilisés en très grande quantité est alors très faible.

Nous reviendrons plus loin sur la préparation du milieu N que nous avons utilisé pendant plusieurs années, tant pour l'entretien des souches de *Trichomonas* que pour les essais d'activité trichomonacide.

Certains auteurs ont recherché une formule permettant une préparation rapide d'un milieu diphasique tout en rendant possible une pousse satisfaisante des flagellés.

MILIEU DE SOREL (68) :

SOREL, en 1954, propose un milieu diphasique constitué simplement par du bouillon peptoné classique dans lequel on a introduit un fragment de viande ayant servi à sa préparation.

Pour un tube de 10 mm de diamètre, on introduit :

— bouillon peptoné salé	5 ml
— viande, environ	1 ml

Le pH est ajusté à pH : 6,2-6,8 et on stérilise à 110°C pendant vingt minutes.

On ajoute environ 1 000 unités de pénicilline par tube afin de limiter une prolifération microbienne préjudiciable au lancement de la souche et non pour obtenir une culture pure.

Comme nous l'avons signalé dans un précédent chapitre, le milieu de SOREL convient parfaitement à la culture de *Candida albicans* et par ailleurs la présence de ce champignon exerce une action favorable sur le développement des flagellés. Le fait a été confirmé récemment par DE CARNERI. Il est en contradiction avec les constatations antérieures de PETERSON, l'article récent de KASANI, ainsi qu'avec la plupart des observations cliniques.

L'ensemencement du milieu de SOREL se fait en introduisant à demeure l'écouvillon qui a servi au prélèvement. L'incubation a lieu à 37°C, les repiquages pouvant être effectués tous les sept jours.

De préparation facile, le milieu de SOREL possède toutefois un inconvénient majeur : sa composition est mal définie, ses éléments constitutifs ne répondant pas à une connaissance analytique précise.

MILIEU DE LASH (47) :

En vue d'une standardisation quantitative et qualitative, LASH propose, en 1948, un milieu diphasique de conception différente et fort complexe.

Il est constitué d'une phase solide à base de gélose, dextrose, PO_4HNa_2 , hydrolysât de levure (prominogène), sérum humain défibriné, eau distillée et d'une phase liquide comportant de nombreux constituants parmi lesquels on retrouve des sels minéraux, des sucres, de l'hydrolysât de levure; de la gélose et de l'extrait de foie SQUIBB lui-même très complexe.

LASH présente son milieu comme un milieu d'entretien et le désigne sous le nom de « F.P.M. ». Il propose un milieu d'isolement F.I.M., liquide constitué par la phase liquide du milieu F.P.M. moins le complexe de foie.

L'emploi successif de ces deux milieux a permis à l'auteur d'obtenir des cultures amicrobiennes en milieu diphasique, les germes étant éliminés au préalable par passage sur le milieu d'isolement additionné d'antibiotiques.

Malgré cet avantage, il semble que la culture pure ainsi obtenue ne soit pas très résistante, d'où la nécessité de fréquents repiquages.

Parmi les autres inconvénients de ce milieu, rappelons aussi la longueur de sa préparation et sa trop grande complexité.

MILIEU DE MORENAS (58) :

Bien que peu utilisé, ce milieu diphasique de formule simple mérite d'être mentionné.

Il est composé de sérum coagulé et d'une phase liquide contenant de l'asparagine, du glucose et de la solution de RINGER.

Le pH est alcalin : 8 environ, on y ajoute aussi 1 000 U.I. par ml de pénicilline. La pousse est moyenne et on doit effectuer les repiquages tous les six jours.

MILIEU DE CREZE :

Avant de terminer cette rapide étude des milieux diphasiques, citons le milieu de CREZE qui dérive du milieu N de l'Institut Pasteur.

Il comprend un plan incliné de sérum coagulé et une partie liquide de composition suivante :

— glycogène	0,25 %
— sérum frais	10,00 %
— solution de RINGER	90,00 %
— amidon de riz	1,00 g

On répartit, à raison de 8,5 ml par tube, et on ajoute 1 000 U.I. par ml de pénicilline.

Les flagellés poussent mieux sur ce milieu si on recouvre sa surface d'une petite quantité d'huile de vaseline dans le but de favoriser l'anaérobiose qui avantage toujours la croissance des *Trichomonas*.

Madame Véra ROIRON-RATNER, qui a utilisé ce milieu pour ses recherches, estime possible de supprimer à la fois l'amidon de riz et la phase solide lorsque la souche est suffisamment adaptée au milieu.

Nous sommes personnellement convaincu qu'une souche de *Trichomonas vaginalis* ne peut se maintenir bien longtemps dans ces conditions, et les tentatives que nous avons faites avec le milieu N de l'Institut Pasteur pour le simplifier, en supprimant ces deux éléments, se sont toujours soldées par un échec.

IV. — PRINCIPAUX MILIEUX MONOPHASIQUES UTILISÉS POUR LA CULTURE DES TRICHOMONAS

1°) Généralités.

Malgré l'intérêt présenté par les milieux diphasiques pour l'entretien des souches de flagellés, il semblait évident qu'un milieu liquide homogène, de formule simple et permettant une culture microbienne vivace, était préférable, en particulier pour les essais *in vitro* des substances trichomonacides.

De nombreux auteurs s'étaient depuis longtemps penchés sur ce problème. CAILLEAU, en 1939, avait tenté de purifier une souche de *Trichomonas gallinaceum* en utilisant le para-amino-phényl-sulfamide, mais ce sulfamide, comme les autres substances antiseptiques utilisées jusqu'alors, n'avait qu'une action bactériostatique, les subcultures se trouvant contaminées dès qu'on essayait de s'affranchir de l'agent chimique.

L'apparition de la pénicilline et de la streptomycine, substances à la fois bactériostatiques et bactéricides, permit de résoudre d'une manière satisfaisante ce problème capital.

TRUSSEL, dès 1943, proposa la pénicilline pour purifier les souches qu'il faisait pousser sur son milieu ; l'année suivante ADLER et PULVERTAFT publiaient les résultats que leur avait donnés la pénicilline pour obtenir des cultures pures de flagellés.

En 1946, QUISNO et FOTER, reprochant à la pénicilline leurs échecs devant les bactéries-Gram — très fréquentes dans les cultures — vont lui préférer la streptomycine, et la même année se rangent à leur avis WILLIAM et PLASTRIDGE.

Sans négliger l'emploi des substances antibiotiques pour purifier des souches de *Trichomonas*, certains auteurs et avec eux JOHNSON dès 1942 (36), puis MAGARA (55) en 1953, préconisent l'emploi de l'anaérobiose pour séparer les flagellés de leurs germes associés.

S'appuyant sur cette particularité biologique des *Trichomonas*, ces auteurs allaient réaliser des cultures amicrobiennes par élimination pure et simple de la flore aérobie.

Nous verrons plus loin les différentes techniques qui ont été proposées pour obtenir cette anaérobiose.

Ces méthodes chimiques ou physiques n'excluent pas d'ailleurs l'utilisation judicieuse d'un antibiotique qui seul permet une diminution rapide des germes associés pendant la période d'adaptation de la souche.

Nous décrirons ensuite certaines techniques particulières, comme celle de DE CARNERI, où la séparation des flagellés s'obtient par leur migration dans des tubes de forme spéciale. Cette méthode est fondée sur la mobilité et l'anaérotropisme des *Trichomonas*.

Nous terminerons ce chapitre en mentionnant les essais effectués par ASAMI, NODAKE et MENO pour cultiver les parasites sur un milieu solide. Cette technique permettrait l'obtention de cultures pures en nappe sur boîte de PETRI et, peut-être, la réalisation d'antibiogrammes dans les mêmes conditions qu'en bactériologie.

2°) Milieux monophasiques liquides.

A. — MILIEUX DE CULTURE OU LA PURIFICATION DE LA SOUCHE EST OBTENUE PAR L'ACTION CONJOINTE D'ANTIBIOTIQUES ET DE L'ANAÉROBIOSE OBTENUE PAR L'INTERMÉDIAIRE D'UNE SUBSTANCE CHIMIQUE.

Les milieux que nous allons décrire et qui répondent à ces conditions ont une formule nouvelle qui tient compte des exigences du parasite. On y rencontre les éléments suivants :

- a) bouillon peptoné
- b) substances glucidiques (glucose, maltose et dextrose),
- c) sérum frais (homme, cheval, bœuf),
- d) foie (extrait ou infusion).
- e) oxydo-réducteurs qui permettent d'obtenir un certain degré d'anaérobiose (cystéine, asparagine, réductose),

- f) tampons dont le but est de déterminer l'acidification du milieu. Le plus utilisé est la solution de RINGER.

MILIEU DE JOHNSON et TRUSSEL dit MILIEU C.P.L.M. (37) :

Mis au point par ces auteurs en 1943, il reste l'un des milieux les plus utilisés aujourd'hui.

Comme nous le verrons dans la deuxième partie de cet exposé, nous avons fréquemment utilisé ce milieu pour l'entretien des souches de flagellés et pour les essais *in vitro*. Nous reviendrons donc plus loin sur les détails de sa préparation.

Sa composition est la suivante :

— bactopectone Difco	32,0 g
— bactoagar Difco	1,6 g
— cystéine ClH	2,4 g
— maltose	1,6 g
— infusion de foie Difco	320,0 ml
— solution de RINGER	960,0 ml
— bleu de méthylène à 0,5 %	0,7 ml

Le pH est ajusté à 5,8-6 et la solution répartie à raison de 8 ml par tube. Après stérilisation à l'autoclave et refroidissement, le milieu est additionné de 2 ml de sérum frais stérile par tube et de 5 à 10 000 U.I. de pénicilline. On repique toutes les 48 heures.

On remarque que les éléments constitutifs de ce milieu sont assez mal définis, tels sont :

- la bactopectone Difco,
- le bactoagar Difco,
- l'infusion de foie Difco.

Il faut y ajouter, comme toujours, le sérum sanguin.

Toutefois, la composition centésimale de la bactopectone étant donnée par le fabricant, et l'infusion de foie pouvant être remplacée par un mélange de substances définies, on voit que seul le sérum sanguin apporte vraiment dans cette formule un facteur inconnu.

Par ailleurs, le chlorhydrate de cystéine est destiné à assurer l'anaérobiose qui est vérifiée grâce au bleu de méthylène jouant ainsi le rôle d'un indicateur.

Dans ce milieu, l'action conjointe d'un antibiotique et de l'anaérobiose permet facilement d'éliminer la presque totalité de la flore associée.

MILIEU DE Mc ENTEGART (54) :

A partir de la formule du milieu C.P.L.M. et dans un souci de standardisation, les auteurs vont s'efforcer d'éliminer le plus possible les éléments mal définis pour les remplacer par des produits de synthèse, le but poursuivi restant toujours l'obtention de cultures pures.

Le milieu de Mc ENTEGART, qui dérive du milieu de JOHNSON et TRUSSEL, mérite d'être cité, car il correspond à une formule simple et les substances qui le composent sont assez bien définies.

Sa composition est la suivante :

— solution de RINGER modifiée	73,00 %
— maltose	0,12 %
— infusion de foie Difco	24,00 %
— tryptose	2,40 %
— cystéine ClH	0,18 %

Le pH est automatiquement à 6,5 ; on stérilise par filtration sur Seitz, on ajoute ensuite 20 % de sérum frais et 1 000 U.I./ml de pénicilline ainsi que 500 U.I./ml de chloramphénicol.

La culture est abondante, on repique toutes les 48 heures.

MILIEU AU THIOGLYCOLLATE :

Ce milieu a l'avantage d'être fourni tout préparé par les Laboratoires Difco. Il répond à la formule suivante :

— bactocaséine	15,00 g
— bacto (Yeart)	5,00 g
— bactodextrose	5,00 g
— ClNa	25,00 g
— l-cystine Difco	0,75 g
— acide thioglycollique	0,3 ml
— bactoagar	0,75 g
— résazurin	0,001 g par litre

Ce mélange de poudre doit être réhydraté au moment de l'emploi.

Après stérilisation à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes, on le répartit et on y ajoute le sérum stérile. Nous reviendrons plus loin sur la préparation de ce milieu que nous avons utilisé dans nos recherches.

MILIEU DE KUPFERBERG :

Utilisé par KUPFERBERG (USA) pour étudier le métabolisme des flagellés, c'est un milieu simple où l'on retrouve les éléments constitutifs des milieux précédents. Sa formule est la suivante :

— bactoagar	0,10	%
— maltose	0,10	%
— trypticase	2,00	%
— cystéine ClH	0,125	%
— bleu de méthylène	0,00025	%
— eau distillée, q.s.p.	100,00	%

On ajuste le pH à 6 et on distribue à raison de 9 ml par tube.

On stérilise à l'autoclave et après refroidissement on ajoute 1 ml de sérum frais, puis 250 U.I. de pénicilline et 1 mg de streptomycine par ml de milieu.

La pousse est rapide et abondante et permet le diagnostic dès le lendemain.

Malheureusement, ce milieu ne se conserve que peu de temps à la glacière.

Tout récemment, le Baltimore Biological Laboratory (B.B.L.) a mis en vente le milieu dit « Trichosel broth KUPFERBERG » d'après la formule de KUPFERBERG. Ce milieu est actuellement très utilisé aux USA.

Nous pouvons citer encore parmi les milieux de conception moderne et qui répondent aux données indiquées, le milieu de ROIRON-RATNER (63), excellent pour le diagnostic, mais de courte conservation, et le milieu décrit par JOUMANA NEHME (38) à base de « casamino-acids » de Difco. Il ne semble pas, *a priori*, qu'ils présentent de réels avantages sur les milieux déjà décrits.



Les quelques milieux dont nous venons de donner une brève description permettent d'obtenir des cultures, sinon amicrobiennes, du moins très peu riches en germes.

Le procédé utilisé est toujours le même, on associe un ou deux antibiotiques à l'action réductrice de la cystéine dont le but est d'assurer un certain degré d'anaérobiose, tout au moins dans le fond des tubes où se développent les protozoaires.

Cette substance contribue à l'élimination progressive de la flore aérobie et favorise la croissance des flagellés qui s'accommodent bien du manque d'oxygène. Nous verrons plus loin que

l'anaérobiose peut être obtenue par des moyens physiques qui facilitent l'obtention de souches rigoureusement pures.

Avant de passer à l'étude des milieux qui mettent en œuvre ces procédés, nous décrirons encore un milieu de culture de réalisation récente qui nous paraît devoir retenir l'attention par la simplicité de sa formule. Nous remarquerons que l'auteur n'a pas utilisé l'anaérobiose pour se libérer de la flore microbienne, mais simplement une association de pénicilline et de streptomycine.

MILIEU DE FEINBERG ET WHITTINGTON (24) 1957 :

C'est le milieu le plus utilisé en Angleterre. Il répond à la formule :

— protéolysat de foie	25,0 g
— ClNa	6,5 g
— dextrose	5,0 g
— sérum de cheval inactivé	80,0 ml
— eau distillée	1 000,0 ml
— pénicilline	10 ⁶ , U.I.
— streptomycine	500 000, U.I.

On dissout les composants solides dans l'eau distillée, on ajoute le sérum et on ajuste le pH à 6,4 par addition de soude N/10 (environ 9 ml par litre de milieu).

On stérilise ensuite par filtration au Seitz et on répartit stérilement dans des tubes fermés à vis qui sont conservés au frigidaire à + 5°C.

Après ensemencement, les cultures sont mises à l'étuve à 37°C pendant 4 à 5 jours et examinées trois fois au microscope pendant cette période. Il est préférable de centrifuger les cultures avant de les examiner pour le cas d'une faible pousse.

Les *Candida* poussent bien sur ce milieu qui peut être lyophilisé et reconstitué extemporanément par addition d'eau.

Il a l'avantage d'être simple, bon marché, facile à préparer ; il se conserve assez longtemps et peut servir à la fois pour la recherche des *Trichomonas* et des *Candida*.

B. — MILIEUX DE CULTURE OU LA PURIFICATION DE LA SOUCHE EST OBTENUE PAR L'ACTION CONJOINTE D'ANTIBIOTIQUES ET DE L'ANAÉROBIOSE OBTENUE PAR UNE MÉTHODE PHYSIQUE.

MILIEU DE MAGARA - AMINO - YOKOUTI (55) :

Ce milieu que nous avons utilisé pendant plusieurs années et qui revêt un intérêt considérable, tant pour l'entretien des souches que pour les essais chimiothérapiques en culture, sera décrit plus loin en détail.

L'anaérobiose est réalisée ici, non plus grâce à des substances oxydo-réductrices (cystéine-asparagine), mais par l'emploi de tubes de HALL, tubes qui possèdent un étranglement recouvert d'une bille de verre.

Le milieu se trouvant en dessous de la bille est donc réellement à l'abri de l'air.

Sa formule simple est la suivante :

— bouillon VF pour anaérobiose (milieu de WEINBERG et Goy fourni en flacons stériles par l'Institut Pasteur et constitué par du bouillon de viande et de foie de bœuf)	100,0 ml
— sérum de cheval	10,0 ml
— glucose	0,5 %
— pénicilline	20 000 U.I. par tube

Certains auteurs préconisent l'emploi d'une association pénicilline-streptomycine.

L'ensemencement s'effectue à l'aide d'une pipette Pasteur fine que l'on glisse sous la bille de verre.

Les flagellés se multiplient abondamment dans le fond des tubes au bout de 48 heures, à la température de 37°C.

Les repiquages se font tous les deux à sept jours suivant les cas.

Vers la 4^e à 5^e subculture, la souche prend de la vigueur et les germes deviennent très rares. On vérifie la stérilité par des prélèvements sur lesquels on effectue des colorations par la méthode de Gram. On peut aussi contrôler cette stérilité par des ensemencements sur bouillon, agar au sang, gélatine et milieu au thioglycollate.

L'intérêt principal de ce milieu, facile à préparer, réside dans la possibilité d'obtenir des cultures réellement pures et bien vivaces dans des délais assez rapides.

Les souches ainsi entretenues sont particulièrement stables et se prêtent bien aux essais *in vitro*.

MILIEU DE DE CARNERI (21) (22) :

En 1956, DE CARNERI propose un milieu et un dispositif expérimental pour isoler les *Trichomonas* des bactéries et des champignons inférieurs auxquels ils se trouvent souvent associés dans leur milieu naturel.

Les germes sont éliminés par les antibiotiques, les champignons grâce à un appareillage spécial conçu pour mettre à profit l'anaérotropisme et la mobilité des flagellés.

La présence de cystéine permet la formation d'une certaine anaérobiose, favorise la prolifération des protozoaires et nuit au développement de la flore aérobie.

Le milieu de DE CARNERI dérive du milieu C.P.L.M. Il a pour formule :

— bactopectone	32,00	g
— bactoagar	1,60	g
— maltose	1,60	g
— ClNa	5,76	g
— CO ₃ HNa	0,096	g
— Cl ₂ Ca	0,096	g
— ClK	0,096	g
— eau	960,00	ml
— cystéine	2,10	g
— bleu de méthylène à 0,5 %.	0,70	ml
— infusion de bactoliver	24,00	g dans 320 ml
— sérum humain	10,00	%

On le prépare de la manière suivante :

On met en suspension 24 g de bactoliver dans 320 ml d'eau, on chauffe une heure à 65°C, on maintient l'ébullition pendant 5 minutes et on filtre.

On ajoute ensuite l'agar, la peptone, le maltose et les sels ; quand le tout est dissous, on verse la cystéine et le bleu de méthylène.

On ajuste le pH à 6 et on répartit à raison de 9 ml par tube. On stérilise alors 30 minutes à 112°C, puis on ajoute stérilement 1 ml de sérum à chacun des tubes.

Le milieu est conservé à 25°C. On ne peut l'utiliser que pendant deux semaines environ à cause de l'oxydation progressive de la gélose.

Isolement des *Trichomonas* d'une souche microbienne :

Le milieu précédent est additionné de 1 mg de streptomycine et de 1 000 U.O. de pénicilline par ml.

Les tubes de culture classiques sont remplacés par des tubes en forme de W de 15 cm $\times$ 1 cm où l'on introduit stérilement 15 ml de milieu.

L'ensemencement du produit pathologique se fait par l'ouverture A ; la méthode a été décrite pour *Trichomonas vaginalis*, mais elle donne des résultats identiques avec *Trichomonas hominis* et *Trichomonas fœtus* qui possèdent, en particulier le dernier, une beaucoup plus grande mobilité.

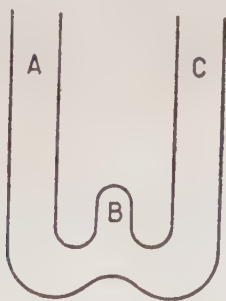
La présence de gélose en petite quantité diminue les courants de convection et maintient les germes et les champignons à la partie supérieure du tube ; par contre, les flagellés, grâce à leur poids et à leurs mouvements, vont tomber au fond du tube A et leur prolifération sera intense en B au contact des champignons. Nous avons déjà signalé que SOREL avait remarqué cette action favorable des champignons du genre *Candida* vis-à-vis des cultures de *Trichomonas*.

La rapidité du développement décroît dans le sens de *Trichomonas vaginalis* et *Trichomonas hominis*.

Après 48 heures, on pourra alors prélever par l'ouverture C les flagellés qui se sont développés, à l'exclusion des germes associés.

Avec ce procédé, la densité de la population flagellée peut atteindre 1 million et même 2 millions et demi d'individus par ml.

Le repiquage peut être effectué sur un autre milieu où les subcultures seront bactériologiquement pures.

**Cultures pures mixtes : *Trichomonas* + *Escherichia coli* :**

Ayant ainsi obtenu des souches à l'état pur, DE CARNERI pense qu'il est avantageux, pour les conserver, d'y associer une espèce

microbienne judicieusement choisie et il retient *Escherichia coli* à cet effet.

Le milieu de culture utilisé est le milieu diphasique de l'Institut Pasteur. Il estensemencé avec une anse de platine d'une culture d'*Escherichia coli* se développant sur gélose. On ajoute ensuite une goutte de culture pure de *Trichomonas* poussant sur milieu C.P.L.M. sans antibiotique.

Le gros avantage de cette technique résiderait dans l'espace-ment considérable des repiquages. *Trichomonas foetus* et *Trichomonas vaginalis* resteraient vivants plus d'un mois, *Trichomonas intestinalis* plus de quatre mois.

Pour libérer les protozoaires du colibacille, il suffirait d'effectuer le repiquage sur milieu C.P.L.M. additionné de 1 mg par ml de streptomycine et de 1 000 U.O. par ml de pénicilline.

Cette technique relativement simple et bien standardisée paraît très séduisante, le problème de l'entretien des souches étant particulièrement difficile à résoudre ; malheureusement, et nous le verrons plus loin, il ne nous a pas été possible de prolonger la survie d'une culture pure mixte dans les conditions indiquées par l'auteur sans effectuer de repiquages beaucoup plus fréquents.

C. — MILIEU DE CULTURE SIMPLIFIÉ POUR TRICHOMONAS FOETUS (44).

Avant de terminer cette rapide étude des milieux liquides, nous citerons encore un milieu monophasique proposé récemment par LAMY pour la culture de *Trichomonas foetus*.

Sa composition très simple est la suivante :

— solution de RINGER	7 parties
— sérum de cheval	1 partie
(soit 15 ml de sérum pour 100 ml de RINGER).	
— amidon de riz	traces

Le pH est ajusté à 7,2 - 7,4.

Tous ces éléments stériles au départ sont répartis à raison de 5 ml par tube. La conservation est indéfinie à la glacière.

La culture se fait à 37°C, les repiquages pouvant être effectués seulement tous les 8 jours.

L'amidon de riz n'est pas aussi activement phagocyté par *Trichomonas foetus* que par les autres *Trichomonas*, mais sa présence favorise la multiplication.

Ce milieu est particulièrement recommandé pour les essais de substances trichomonacides. L'auteur conseille son emploi tel quel, sans addition d'antibiotique dont l'influence est toujours

possible sur les protozoaires, d'où les causes d'erreur dans l'interprétation des essais chimiothérapiques *in vitro*.

3°) Milieux monophasiques solides.

Nous allons maintenant décrire sommairement trois techniques utilisées pour l'entretien des souches sur milieu solide.

La culture sur de tels milieux offre un double avantage :

- a) elle permet d'espacer notablement les délais de repiquage ;
- b) elle offre aux chercheurs des conditions avantageuses pour les essais chimiothérapiques *in vitro*.

MILIEU DE SAMUEL (66) :

SAMUEL, en 1954, entretient avec succès des protozoaires sur bactoagar sans effectuer de repiquage pendant une période de 23 jours.

Sa technique est la suivante :

On ensemence le plan incliné de l'agar avec 0,2 ml d'une culture de *Trichomonas vaginalis* se multipliant sur milieu C.P.L.M.

Le tube bouché au coton est recouvert de paraffine et placé à l'étuve à 37°C.

Dans les 48 heures, une ligne blanche opaque apparaît à la limite du plan incliné et de l'espace libre. Cependant, pendant trois semaines, on ne peut déceler la présence de *Trichomonas* mobiles sur le plan incliné.

Vers le 20^e jour, on recouvre la surface solide avec 2 ml de milieu C.P.L.M. et trois jours après, les prélèvements effectués montrent la présence de nombreux parasites très mobiles et d'apparence normale.

Le maintien des *Trichomonas* à l'état latent sur le plan incliné pendant trois semaines présente un intérêt certain ; en effet, un des problèmes les plus difficiles à résoudre pour les Parasitologues est la nécessité des fréquents transferts des protozoaires sur les milieux liquides.

MILIEU SOLIDE DE ASAMI, NODAKE ET MENO (3) :

Ces auteurs prévoient un premier temps de purification sur un milieu très proche du C.P.L.M. additionné d'antibiotiques.

Dans un second temps, ils repiquent la culture sur un milieu solide constitué par une solution de 2 g d'agar dans 100 ml du milieu précédent, mais sans cystéine ni bleu de méthylène.

L'outillage prévu se compose, soit de tubes, soit de boîtes de PETRI.

Si on utilise les boîtes de PETRI, on remplit le récipient intérieur avec le milieu solide sur lequel on ensemence 0,2 ml d'une culture pure de *Trichomonas* âgée de 48 heures. Le récipient supérieur contenant la gélose nutritive est ensemencé avec *Escherichia coli*, espèce aérobie très active, qui permet le maintien d'un certain degré d'anaérobiose.

Cette méthode est utilisée pour la culture des schizomycètes anaérobies.

Les boîtes scellées sont mises à l'étuve à 37°C et, après 48 heures, on observe la formation de colonies constituées par une masse de *Trichomonas* mobiles. Malheureusement, au cours des transferts, ces colonies finissent par disparaître. La cause de cet échec serait due à une humidité insuffisante à la surface du milieu.

La culture profonde en tubes donnerait de meilleurs résultats.

Les colonies se forment alors à quelque distance de la surface et sont constituées par des cellules très mobiles. Les subcultures sont encore florissantes au bout de dix transferts.

Un des avantages de cette technique est l'utilisation du fil de platine pour effectuer les repiquages qui sont également moins fréquents.

La méthode permet par conséquent le prélèvement d'une colonie unique, ce qui est d'un grand intérêt pour l'isolement d'une lignée pure.

MILIEU DE FILADORO ET ORSI (25) :

Si le milieu solide d'ASAMI constitue un notable progrès dans le domaine des milieux destinés à la culture pure des *Trichomonas*, l'entretien des souches étant réalisé avec un minimum de transferts, il présente toutefois l'inconvénient de mal se prêter à l'utilisation d'une technique commode pour les essais de substances trichomonacides.

Il semble donc admis que seule la culture sur milieux solides en boîtes de PETRI puisse permettre, non seulement d'obtenir des cultures pures par repiquage de colonies isolées, mais aussi d'employer pour des études quantitatives les méthodes pratiques communément utilisées en bactériologie.

Soucieux de ces considérations, FILADORO et ORSI ont décrit, en 1958, une technique permettant le développement des protozoaires à la surface d'un milieu coulé en boîte de PETRI.

Description du milieu :

Le milieu utilisé pour l'isolement et le maintien des souches est le milieu C.P.L.M. de TRUSSEL ; ce milieu liquide sans agar est recouvert d'une mince couche de vaseline qui favorise la culture en anaérobiose.

Ce même milieu, contenant 1 % d'agar et versé en boîte de PETRI, permet le développement des flagellés en profondeur ; s'il contient 2 % d'agar, le développement se fait en surface.

Dans tous les cas, on y ajoute 10 % de sérum de cheval ou de bœuf et une solution de pénicilline et de streptomycine de manière à obtenir une concentration finale de 50 unités par ml de pénicilline et de 100 microgrammes par ml de streptomycine.

Mise en culture sur le milieu solide :

a) Pour obtenir une surface de pousse sur le milieu C.P.L.M. contenant 2 % d'agar, on fait fondre le milieu à 100°C, on le laisse refroidir à 50°C et on le verse à l'intérieur des boîtes de PETRI après addition de sérum et de la solution de pénicilline et de streptomycine.

Puis on ensemence, soit en stries à l'aide d'une anse de platine, soit en versant à la surface du milieu solide une petite quantité de milieu C.P.L.M. liquide sur lequel se sont développés les flagellés.

L'anaérobiose est obtenue en plaçant les boîtes dans un dessiccateur où règne une atmosphère de gaz carbonique. Le tout est maintenu à 37°C pendant 48 heures.

Dans ces conditions, les auteurs obtiennent un développement considérable de la culture après 36 heures, développement qui se continue pendant plus de 48 heures.

b) Pour obtenir une culture à l'intérieur du milieu C.P.L.M., on mélange 1 % d'agar au milieu chauffé à 100°C, on laisse refroidir à 42°C et après avoir ajouté rapidement le sérum, la pénicilline et la streptomycine, on verse 0,5 ml d'une culture de 24 heures sur milieu C.P.L.M. liquide.

Les milieux sont ensuite mis à solidifier, puis laissés à l'étuve à 37°.

FILADORO et ORSI ont apporté quelques modifications à ce mode opératoire pour les mesures d'activité trichomonastatique de différentes substances.

Nous décrivons au chapitre suivant une application de la méthode de diffusion dans l'agar à la détermination de l'activité trichomonacide de la trichomycine.

4°) Usage du froid pour l'entretien des souches ;

Milieu de Mc ENTEGART (54) :

Mc ENTEGART a proposé, en 1954, un procédé de conservation des *Trichomonas* qu'il est intéressant de signaler avant de clore ce chapitre.

Le principe de la méthode est le suivant :

On ensemence un milieu contenant 10 % de glycérol, puis la culture est soumise à un lent refroidissement jusqu'à obtention d'une température de -79°C .

Dans ces conditions, la souche peut être conservée quatre mois sans repiquage, ce qui présente un réel intérêt pour l'entretien des cultures de *Trichomonas*.

DESCRIPTION DE QUELQUES TECHNIQUES D'ESSAIS *IN VITRO* UTILISÉES POUR LA DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ TRICHOMONACIDE ET TRICHOMONASTATIQUE DE DIFFÉRENTES SUBSTANCES

GÉNÉRALITÉS

La description des principaux milieux destinés à la culture des *Trichomonas* étant faite, il nous est maintenant possible de passer à l'étude de quelques techniques utilisées par différents auteurs pour les essais de substances trichomonacides *in vitro*.

Les techniques d'essais *in vitro* qui précèdent les essais *in vivo* ont pour but le tri préliminaire de corps supposés actifs et dont l'étude doit être ensuite poursuivie sur l'animal.

La plupart des travaux réalisés depuis quelques années dans le domaine des essais ont trait aux méthodes *in vivo* qui font appel à l'infestation expérimentale d'animaux de laboratoire. Ces méthodes, qui semblent avoir conquis de nombreux chercheurs, reproduisent d'assez près les conditions d'infestation humaine et leur intérêt est d'autant plus grand que les récents essais d'infestation expérimentale de la Rate et du Hamster doré ont été couronnés de succès.

Par contre, les essais *in vitro*, indispensables pour effectuer une première sélection des substances à essayer, se heurtent toujours aux difficultés qu'ont les auteurs pour éliminer les imperfections de ces méthodes. De nombreux éléments encore imprécis, inhérents à la souche, à l'âge des cultures, à la technique elle-même, et surtout à la composition du milieu de culture ou au rôle joué par la flore associée, retirent à ces essais une partie de l'intérêt qu'on se doit d'y attacher.

Au cours des deux précédents chapitres, nous avons mis l'accent sur les perturbations que peuvent produire les germes associés sur la stabilité d'une souche et nous avons montré l'intérêt de mettre les flagellés en culture pure.

Nous y reviendrons au cours de la description de nos travaux personnels.

1°) Essais d'activité trichomonacide :

La majorité des méthodes *in vitro* proposées par les expérimentateurs consiste à déterminer, pour une substance donnée, la concentration minimum pouvant provoquer la mort des parasites mis en culture pure ou impure pendant un temps donné.

Il s'agit donc d'une détermination de l'activité trichomonacide de la substance, ces essais ayant pour but la recherche de la dose minimum trichomonacide.

Certaines techniques proposées pour les essais pharmacologiques des antiamibiens sont susceptibles d'être appliquées aux essais d'activité trichomonacide, à condition toutefois d'employer le milieu de culture approprié.

Les milieux diphasiques, décrits au chapitre précédent, peuvent être utilisés pour les essais en tubes.

Parmi ceux-ci, le milieu N de l'Institut Pasteur est le plus couramment utilisé.

Le principal inconvénient de ces milieux est de ne pas permettre une culture amicrobienne des flagellés ; il faut y ajouter la répartition inégale des substances entre les deux phases en raison de leur adsorption sur le plan protéique solide.

Quelques auteurs ont décrit des méthodes d'essais sur milieux monophasiques liquides ou solides ; ces milieux ont l'avantage de faire agir les substances sur des cultures pures de *Trichomonas*. Nous décrirons dans ce chapitre quelques-unes de ces techniques.

Quels que soient les milieux utilisés, l'étude d'une substance trichomonacide peut être conduite, comme le propose PIETTE (60) à propos des antiamibiens, de deux façons considérées comme classiques :

a) *Inhibition du départ des cultures :*

On peut introduire dans le milieu choisi des quantités variables de produits inhibiteurs, on ensemence ensuite les flagellés et après un temps variable, trois à quatre jours en général, on détermine la concentration minimum capable d'empêcher le développement de la culture.

b) *Action léthale sur les flagellés en culture de quatre jours :*

Dans les cultures de quatre jours préalablement vérifiées, on introduit les produits inhibiteurs et on évalue la concentration léthale après 24 à 72 heures de séjour à l'étuve à 37°C.

Dans tous les cas, on vérifie la vie ou la mort des protozoaires par un examen microscopique du contenu des tubes.

Dans le cas où les flagellés paraissent tous morts, il est nécessaire de confirmer ce résultat par la subculture sur un milieu neuf.

Il est possible, enfin, d'associer à ces méthodes des essais par contacts directs sur lame. Dans ce cas, les parasites sont mis en contact avec des concentrations variées de substances entre lame et lamelle. On recherche quelles sont les concentrations de produits capables de tuer un nombre donné de flagellés pendant un temps déterminé.

2°) Essais destinés à la détermination de l'activité trichomonastatique d'une substance inhibitrice :

L'activité trichomonastatique peut être exprimée par la dose minimum capable de suspendre la multiplication des flagellés sans altérer leur capacité de reproduction quand on les repique sur un milieu neuf.

Des techniques ont été proposées par CUCKER, KUPFERBERG et récemment par SVEL. Elles sont moins utilisées que les méthodes d'essais de l'activité trichomonacide.

*
**

Il sort évidemment du cadre de ce travail de décrire toutes les techniques mises au point pour l'étude des substances inhibitrices. Nous nous bornerons à donner le principe de quelques-unes d'entre elles en les proposant comme des exemples de méthodes assez couramment utilisées en France ou à l'Etranger.

Nous verrons au cours de cette description que les expérimentateurs ont pu éliminer certaines causes d'erreur dans les essais de conception récente, les améliorations apportées allant souvent, d'ailleurs, à l'encontre de la simplification des méthodes.

PLAN DU CHAPITRE

I. — ESSAIS D'ACTIVITÉ TRICHOMONACIDE.

A. — TESTS EN TUBES.

1°) Essais sur milieux diphasiques (souches impures) :

Principes des méthodes décrites par PIETTE en 1948 et GUIGNARD en 1949 pour la détermination de l'activité amœbicide de différentes substances et pouvant être appliquées aux essais d'activité trichomonacide.

2°) Essais sur milieux monophasiques liquides (souches pures ou pratiquement pures) :

Méthodes de :

- JOHNSON et TRUSSEL sur milieu C.P.L.M., 1943.
- Mc DONALD, 1949.
- WILEINS et HINSHAW sur milieu S.T.M., 1954.
- CUCKLER sur milieu de KUPFERBERG, 1955.
- LYNCH sur milieu de KUPFERBERG, 1955.
- BUSHBY et COPP, 1955.
- SAKAY sur milieu de MAGARA, 1957.
- JENEY sur milieu C.P.L.M., 1958.

3°) Essais sur milieux monophasiques solides :

Méthode de FILADORO et ORSI.

B. — TESTS PAR CONTACT DIRECT ENTRE LAME ET LAMELLE.

Méthode décrite par GUIGNARD en 1949.

II. — ESSAIS D'ACTIVITÉ TRICHOMONASTATIQUE.

Méthode décrite par SAVEL en 1957.

I. — ESSAIS D'ACTIVITÉ TRICHOMONACIDE :

A. — ESSAIS EN TUBES :

1°) Essais sur milieux diphasiques (souches impures) :

MÉTHODE DÉCRITE PAR PIETTE EN 1948 (60)

La méthode décrite par PIETTE en 1948 est appliquée par l'auteur à l'étude des effets de la conessine sur des cultures d'amibes dysentériques. Elle peut être utilisée pour essayer les substances trichomonacides.

Le milieu employé est le milieu classique de DOBELL et LAIDLAW ou milieu N de l'Institut Pasteur.

Dans un premier temps, l'auteur établit une gamme de dilutions très large de la substance, de manière à fixer un point de repère ; il multiplie ensuite les dilutions de la zone intéressante en faisant alors trois tubes pour chaque dilution. Des témoins sont faits en même temps.

a) *Méthode d'inhibition du départ des cultures :*

Dans ces méthodes, l'ensemencement est effectué après la répartition des dilutions. Pour une concentration donnée de substance et pour des concentrations supérieures, on n'observe pas de développement des parasites après un temps d'incubation à 37°C fixé à 4 jours.

Le contrôle est obtenu en faisant des prélèvements dans chaque tube et en examinant la mobilité des protozoaires au microscope.

Les résultats sont exprimés par la concentration la plus faible susceptible de provoquer la mort de tous les parasites dans les trois tubes de la même dilution.

Ce chiffre doit être apprécié avec une approximation compatible avec la précision que peut donner la méthode.

b) *Action léthale sur les parasites en culture de quatre jours :*

Dans cette méthode, des quantités données de substances inhibitrices sont ajoutées à des cultures de 4 jours.

Les examens au microscope sont effectués après 24 heures, 48 heures et 72 heures. On doit tenir compte du pourcentage d'individus morts ou vivants.

L'auteur ne fait état que des résultats de 24 heures.

Il fait mention des différences qu'il a trouvées dans ses expériences, selon qu'il utilise une souche récente ou une souche ancienne.

Il semble qu'une souche âgée montre plus de résistance vis-à-vis des substances inhibitrices qu'une souche récemment isolée.

Les milieux diphasiques utilisés présentent l'inconvénient, déjà signalé, d'une certaine adsorption du produit sur le plan incliné protéique.

PIETTE a cherché à y remédier en proposant de déterminer, à l'aide d'un dosage très précis, la concentration réelle de substance restant dans la phase liquide.

Ce procédé, long et compliqué, ne peut évidemment s'appliquer aux essais en série de produits nouveaux ; de plus, les micro-méthodes nécessaires pour doser quelques microgrammes de produit dans la phase liquide n'existent pas pour toutes les substances pouvant être proposées ; enfin, il ne nous semble pas justifié de rechercher une telle précision sur ce point, alors que d'autres éléments de l'expérience restent imprécis et susceptibles de fausser largement les résultats.

MÉTHODE DÉCRITE PAR GUIGNARD EN 1949 (28)

Utilisant toujours le milieu de DOBELL et LAIDLAW légèrement modifié, GUIGNARD décrit une technique voisine de celle que nous venons de présenter.

Il propose aussi des essais d'inhibition au départ des cultures comprenant un essai préliminaire et un essai définitif.

Les milieux contenant les différentes dilutions sont ensemencés à partir de la souche, puis portés à l'étuve à 37°C, mais au lieu d'en faire l'examen après 4 jours, on les examine tous les jours jusqu'à la mort des cultures, et on note pour chaque tube la richesse de la culture, la mobilité des protozoaires et leur morphologie.

— *Modification de la technique :*

Pour éviter les inconvénients de l'adsorption des substances sur le plan incliné protéique, GUIGNARD propose de mettre brusquement les parasites en contact avec les dilutions du produit à essayer.

Il procède de la façon suivante :

Après avoir ensemencé un certain nombre de tubes, il vérifie, deux jours après, le départ de ses cultures.

A l'aide d'une pipette Pasteur stérile il aspire la presque totalité de la phase liquide, puis il recouvre alors les cultures

avec 2 ml de la phase liquide habituelle renfermant des dilutions variables de produit.

COMMENTAIRES SUR CES DEUX MÉTHODES

La description de ces deux techniques d'essai sur milieux diphasiques montre que le principal souci des auteurs est de trouver une solution au problème de l'adsorption des substances sur le plan incliné protéique.

Nous avons montré les inconvénients de la solution proposée par PIETTE ; celle de GUIGNARD, quoique plus simple, ne saurait être retenue ; en effet, si l'auteur évite le contact, au départ, de l'antiseptique avec le plan incliné il ne conserve cet avantage que 48 heures et c'est au moment où les parasites se développent le mieux qu'il introduit sa substance.

On voit mal comment cette méthode peut rendre compte de la quantité de substance adsorbée par rapport à la technique normale.

Ajoutons que ce problème, comme nous l'avons déjà dit, n'est pas le seul à résoudre. Il ne constitue, en effet, qu'un des éléments générateurs d'imprécision et susceptibles de diminuer la valeur de ces essais.

Si la présence de la flore associée ne peut être mise ici en discussion, ces milieux ne permettant pas la culture amicrobienne, il serait nécessaire de compenser les inconvénients de cette présence par une technique simple donnant des résultats faciles à apprécier et reproductibles dans le temps.

En un mot, il est souhaitable de standardiser au maximum les essais.

Pour cette raison, nous donnons notre préférence à la méthode de PIETTE qui n'effectue qu'un examen des cultures après un temps suffisant et fixé à 4 jours.

Cet auteur a également mis l'accent sur les variations de résistance des souches en fonction de leur âge ; en effet, les résultats obtenus peuvent être fort différents suivant qu'on emploie une souche récente ou une souche âgée.

2°) Essais sur milieux monophasiques liquides (souches pures ou pratiquement pures) :

TECHNIQUE DE JOHNSON ET TRUSSEL SUR MILIEU C.P.L.M., 1943 (37)

JOHNSON et TRUSSEL ont proposé aux Etats-Unis, en 1943, une technique destinée à l'étude systématique des propriétés trichomo-

nacides de substances antiseptiques dont un certain nombre sont des dérivés mercuriels.

— *Principe :*

— Mise en contact d'un nombre connu de flagellés avec des concentrations variables de substances pendant un temps donné.

— Ensemencement sur milieu C.P.L.M. d'une quantité déterminée de ces suspensions et mise à l'étuve des milieux pendant 6 à 9 jours.

— Si la concentration en substance inhibitrice a été suffisante pendant le premier stade de l'essai, les flagellés ne se multiplient pas sur le milieu C.P.L.M.

— *Technique :*

On prépare des dilutions variées des composés à tester de manière que le volume final qui doit contenir 25 % de sérum humain soit de 3,8 ml. Deux méthodes peuvent être utilisées pour obtenir ces dilutions :

Dans la première méthode, la solution de substance est préparée à une concentration déterminée, de telle sorte que l'addition de 1 ml de sérum et de 0,2 ml d'inoculum donne le volume final du mélange à essayer qui est de 4 ml et permette d'obtenir la dilution finale demandée.

Dans la deuxième méthode, l'auteur dissout directement la substance dans l'eau distillée et le sérum de manière à obtenir une concentration finale de 25 % de sérum.

Le volume final du mélange est de 4 ml, sa composition est la suivante :

0,2 ml d'inoculum
2,8 ml de solution de substance
1 ml de sérum.

L'ensemencement est effectué à partir d'une culture pure contenant 2 millions de parasites par ml, soit environ 400 000 flagellés pour 0,2 ml d'inoculum. Cette concentration est vérifiée à la cellule et diluée si cela est nécessaire.

Après un contact de 10 à 15 minutes, on ensemence 0,2 ml du mélange contenant les flagellés sur des milieux C.P.L.M. ajustés à pH 6. On place les tubes à l'étuve, et, après 6 à 9 jours, on contrôle au microscope chacun des tubes.

Les cultures négatives sont celles qui correspondent à une concentration de substance suffisante pour détruire les *Trichomonas* pendant la phase de contact.

— *Discussion :*

Le grand avantage de cette méthode réside dans la mise en contact des parasites à l'état pur avec les diverses concentrations de produit à examiner.

Malgré les progrès réalisés dans le domaine de la standardisation, il persiste toutefois dans cette technique d'essai un élément imprécis qu'il convient de mentionner.

La phase la plus importante de cet essai étant le contact des flagellés avec la substance inhibitrice pendant un temps donné, cette durée d'exposition conditionne la valeur des résultats obtenus.

Pour cette raison, le temps de contact fixé arbitrairement par les auteurs à 10 ou 15 minutes devrait être bien précisé et surtout augmenté.

En effet, les essais que nous décrirons dans la suite de cet exposé montrent que, pour une certaine concentration d'un antiseptique d'activité trichomonacide moyenne, la presque totalité des parasites meurt après un temps de contact de l'ordre de 1 heure à 4 heures. Si on augmente la concentration, le temps léthal diminue, les doses efficaces étant inversement proportionnelles aux durées d'action.

Si la phase de contact est de 15 minutes, la concentration léthale sera d'autant plus grande que la substance est peu active. Une des conséquences directes de ce fait sera la difficulté de faire dissoudre les substances à la fois peu solubles et peu actives qui peuvent être présentées à l'expérimentateur dans les essais en série.

(L'utilisation de TWEEN 80, favorisant la dispersion des substances peu solubles, permettrait peut-être les essais de ces substances dans les conditions précédentes).

TECHNIQUE DE MC DONALD, 1949 (53)

Mc DONALD, en 1949, a proposé une méthode pour déterminer l'activité de différentes substances vis-à-vis de deux *Trichomonas* humains : *Trichomonas intestinalis* et *Trichomonas vaginalis*, et d'un flagellé du tractus génital du bœuf : *Trichomonas fetus*.

— Principe :

Le principe de ces essais consiste à faire agir différentes substances chimiques sur des cultures de densité standard contenant environ 1 million de micro-organismes par ml.

Le critère de l'activité de ces substances est l'arrêt de la mobilité des *Trichomonas* ; les subcultures étant alors négatives.

Les milieux monophasiques susceptibles de donner des cultures pures peuvent être utilisés pour ces essais.

— Mode d'expression des résultats :

Les résultats sont exprimés :

a) par les concentrations tuant les *Trichomonas* en un temps donné (immédiatement, entre 2 et 5 minutes, en 60 minutes) ;

b) par les concentrations maximales qui ne tuent pas les *Trichomonas* en 60 minutes.

— *Résultats des essais :*

Mc DONALD s'est efforcé de définir le mode d'action de différentes substances inhibitrices sur trois espèces de *Trichomonas*.

De ses travaux, on peut tirer deux séries de conclusions :

a) Les trois espèces, *Trichomonas foetus*, *Trichomonas intestinalis* et *Trichomonas vaginalis* sont sensibles aux mêmes produits ; cependant, si *Trichomonas vaginalis* et *Trichomonas intestinalis* réagissent de la même manière à toutes les substances essayées, *Trichomonas foetus* est plus résistant et de plus grandes concentrations de produit sont nécessaires pour le détruire.

b) L'auteur est amené à distinguer plusieurs catégories de substances dont l'activité et le mode d'action sont variables.

C'est ainsi que les colorants et les substances de faible solubilité semblent peu actifs, les antiseptiques mercuriels sont efficaces à de faibles concentrations, les produits chimiques communs et les solutions hypertoniques tuent les flagellés en produisant des modifications dans la morphologie cellulaire, enfin, les détergents provoquent une dissolution immédiate des organismes sans immobilisation préalable.

— *Discussion :*

Les différences dans les techniques et le mode d'expression des résultats expliquent combien il est difficile de comparer les résultats obtenus. Cependant, les chiffres acquis par cette méthode s'accordent sensiblement avec ceux rapportés par JOHNSON et TRUSSEL pour *Trichomonas vaginalis* et par MORGAN et CAMPBELL pour *Trichomonas foetus*.

Là aussi, il s'agit d'une technique préconisant le contact direct *Trichomonas* + substance inhibitrice, mais rendue plus souple que la précédente grâce à l'emploi de plusieurs temps d'exposition différents.

TECHNIQUE DE WILKINS ET HINSHAW
SUR MILIEU S.T.M., 1954 (77)

Ces auteurs ont proposé, en 1954, une technique d'essai originale et l'ont appliquée à l'étude de l'action de divers antibiotiques sur *Trichomonas vaginalis*.

— *Principe :*

Deux séries d'essais ont été décrites :

a) *Les essais microscopiques directs :*

Le principe en est le suivant : on ajoute 1 ml d'une culture de 48 heures de *Trichomonas vaginalis*, se développant sur milieu au thioglycollate, à 1 ml de dilutions diverses de la substance à essayer (la concentration usuelle en flagellés est après dilution de 50 000 à 75 000 cellules par ml).

On place les tubes à l'étuve à 37°C et on les examine après des temps variables, mais ne dépassant pas deux heures, en notant la mobilité des parasites. On compare à un témoin.

Les résultats obtenus sont ceux qui correspondent à la plus petite concentration de substance susceptible de provoquer la mort de la totalité des flagellés.

b) *Les essais d'incubation :*

Dans ces essais, on ajoute 1 ml d'une culture de 48 heures de flagellés se multipliant sur le milieu au thioglycollate à 4 ml de dilution du produit à essayer.

La densité en parasites vérifiée à la cellule est de 10 000 à 15 000 individus par ml.

On contrôle les tubes au microscope après 24 et 48 heures d'incubation à 37°C et les résultats sont rapportés comme précédemment.

— *Milieux utilisés :*

Le milieu de KUPFERBERG et coll. ou milieu à la trypticase simplifié (S.T.M.) peut être employé pour une production de parasites en grand nombre.

Les auteurs de cette technique ont toutefois donné leur préférence au milieu au thioglycollate qui donne des cultures plus stables.

Ce milieu ajusté à pH 6 est additionné avant l'ensemencement de 0,5 ml de sérum stérile de cheval pour 10 ml de milieu.

— *Discussion :*

L'essai microscopique direct peut être mis en parallèle avec la méthode d'essai de Mc DONALD.

Dans ce procédé d'exposition directe, on observe les effets de la substance inhibitrice pendant une courte période.

L'essai d'incubation a pour but d'apprécier les effets de la substance sur des cellules en voie de multiplication pendant une période plus longue.

Une plus grande quantité d'antibiotique est nécessaire pour permettre l'inhibition des cultures après 24 ou 48 heures.

TECHNIQUE DE CUCKLER, 1955 (17)

— *Principe :*

L'auteur propose une méthode destinée à déterminer l'action léthale de dérivés de l'acétylaminonitrothiazole sur des souches de *Trichomonas vaginalis* en cultures sur le milieu à la trypticase modifié.

— *Technique :*

Nous n'insisterons pas sur cette méthode qui est très voisine du test d'incubation de WILKINS et HINSHAW. Les différentes dilutions de substances sont ajoutées à des cultures de *Trichomonas vaginalis*. La concentration trichomonacide minimum est la quantité nécessaire pour tuer 75 000 parasites.

Les cultures sont examinées après 2, 5, 7 et 9 jours d'étuve à 37°C. Le 9^e jour, on confirme l'absence de *Trichomonas* dans les tubes négatifs par contrôle au microscope et par des subcultures sur des milieux neufs.

TECHNIQUE DE LYNCH, 1955 (51) (52)

— *Principe :*

Nous venons de décrire quelques techniques d'essai fondées sur l'action léthale de différentes substances sur les flagellés après une durée d'exposition en générale courte.

On peut penser, avec LYNCH, que les résultats obtenus sont fonction des conditions de l'expérience et notamment de sa durée et du nombre de flagellésensemencés. Aussi l'auteur propose-t-il une technique où le nombre des parasitesensemencés pourra être variable et où la durée d'exposition sera prolongée pendant au moins 48 heures.

La méthode de LYNCH permet :

a) en utilisant un inoculum constant, de vérifier l'action inhibitrice de différentes concentrations de produits sur le développement des protozoaires ;

b) de montrer l'influence du nombre de *Trichomonas*ensemencés sur la concentration minimum inhibitrice.

— *Méthodes d'essai :*

LYNCH utilise des cultures pures de *Trichomonas vaginalis* obtenues sur milieu à la trypticase simplifié contenant 6 % de sérum humain. Ces cultures, repiquées toutes les 48 heures, contiennent environ 3 millions de parasites par ml.

a) *Méthode utilisant un inoculum constant :*

La méthode consiste à ensemencer 300 000 *Trichomonas* mobiles d'une culture de 48 heures dans des tubes contenant 10,5 ml du milieu : trypticase simplifié plus sérum.

A ces tubes, on ajoute des concentrations variables de la substance à étudier.

On place ensuite les cultures à 37°C pendant 72 heures.

A des intervalles réguliers, on détermine par numération à l'hémocytomètre le pourcentage des éléments mobiles pour chacune des concentrations de substance.

b) *Méthode utilisant des inoculums variables :*

Pour étudier les effets de l'ensemencement d'un nombre variable de protozoaires sur la concentration minimum inhibitrice, on introduit des nombres croissants de *Trichomonas* mobiles (par exemple : 300 000, 600 000, 900 000 cellules correspondant à 0,1-0,2-0,3 ml de culture pure) dans des tubes contenant 8,5 ml de milieu à la trypticase simplifié additionné de sérum et d'une quantité fixe de substance qui est égale à la dose léthale en 48 heures trouvée dans l'essai précédent.

Les cultures placées à l'étuve sont examinées comme précédemment.

— *Résultats et discussion :*

Les résultats des premiers essais sont exprimés sous forme de courbes rapportées à un système d'axes de coordonnées.

En abscisse, on porte le temps en heures, et en ordonnées, le pourcentage d'éléments mobiles numérés à l'hémocytomètre.

Une courbe étant faite pour chaque concentration de substance inhibitrice, on détermine ainsi la concentration minimum d'inhibition qui correspond à l'effet léthal après 48 heures.

Il apparaît que l'action léthale est inversement proportionnelle à la période d'exposition.

On vérifie l'activité léthale des substances essayées en effectuant des subcultures sur milieux neufs.

L'échec du développement des *Trichomonas*, même après une incubation prolongée, confirme l'action léthale des différentes concentrations du produit essayé.

Pour les tests utilisant des quantités variables d'inoculum, la concentration minimum d'inhibition, qui est déterminée après 48 heures d'incubation, n'est pas modifiée d'une manière appréciable par l'augmentation du nombre des flagellés ensemencés.

Les résultats ne sont valables que pour des substances de forte activité léthale.

Les cultures issues d'un ensemencement de 150 000 à 300 000 *Trichomonas* mobiles sont détruites après une durée d'incubation de 48 heures, alors que celles qui contiennent de 600 000 à 900 000 parasites au départ le sont après 72 heures d'incubation.

Les résultats fournis par ces derniers essais permettent donc de conclure que, dans certaines limites, le nombre des *Trichomonas* ensemencés n'a pas d'influence appréciable sur l'effet léthal exercé par une substance active.

TECHNIQUE DE BUSHBY ET COPP (5)

— Principe :

Cette méthode est utilisée pour la détermination d'une activité trichomonacide.

Son principe consiste à introduire des quantités décroissantes d'un produit supposé doué d'une certaine activité trichomonacide dans une série de tubes renfermant des cultures de *Trichomonas* maintenues à 37°C depuis 48 heures. On lit les résultats à des intervalles réguliers, soit après 1 heure, 4 heures et 24 heures.

— Technique :

Les auteurs préconisent l'emploi d'un milieu nutritif contenant du glucose, de l'extrait de foie et un facteur de croissance : le pantothénate de calcium.

On y ajoute 20 % de sérum de cheval.

Les cultures qui se développent sur ce milieu sont débarrassées de leurs germes par l'emploi judicieux de pénicilline et de polymyxine.

Test d'activité trichomonacide

On utilise des cultures de 48 heures contenant environ 2 millions de cellules par ml.

On y ajoute les solutions ou les suspensions de substances à essayer à des concentrations diverses.

La mobilité des flagellés est contrôlée après 1 heure, 4 heures et 24 heures.

— Discussion :

La méthode de BUSHBY et COPP a pour but de déterminer l'action léthale d'une substance sur une culture de flagellés de 48 heures.

Elle se distingue donc essentiellement par ce fait de la méthode de LYNCH qui est fondée sur l'inhibition des flagellés au départ des cultures.

Elle s'en rapproche par le procédé de contrôle des résultats à intervalles réguliers.

MÉTHODE DE SAKAI, 1957 (65)

— *Principe :*

SAKAI, KABAYASHI et SAITO ont décrit, en 1957, une technique destinée à l'essai de différentes substances chimiothérapiques.

Cette méthode est fondée sur l'action inhibitrice de ces substances sur *Trichomonas vaginalis* se développant en culture pure sur le milieu de Magara réparti en tubes de Hall.

— *Obtention du milieu d'essai :*

Chaque composant est pesé dans un tube stérile et additionné de 0,5 ml d'alcool à 70°. Après deux heures de contact, on amène à la concentration désirée avec du sérum physiologique.

On ajoute à 8 ml de milieu de Magara 1 ml de dilution de substance, puis 1 ml de sérum de cheval stérile.

— *Technique :*

Les auteurs réalisent une culture pure de flagellés sur milieu de Magara à partir d'un prélèvement vaginal. Ce résultat serait obtenu après environ douze repiquages sur ce milieu.

On ensemence alors les tubes d'essai contenant les différentes concentrations de substances avec 5 gouttes de la culture pure.

Après 4 à 5 jours d'étuve à 37°C, on effectue des prélèvements dans le fond de chaque tube et on les examine au microscope.

On vérifie les résultats obtenus par des subcultures sur milieu neuf.

— *Discussion :*

La technique de SAKAI permet la détermination de la concentration inhibitrice au départ des cultures.

Cette méthode simple donne une appréciation suffisante de l'activité trichomonacide des substances. De plus, l'usage du milieu de Magara, qui permet l'obtention de cultures rigoureusement pures, est un facteur favorable à la standardisation d'une méthode dont nos travaux personnels confirmeront les avantages.

Il convient, cependant, de faire remarquer que l'adaptation d'une souche sur le milieu de Magara à partir d'un prélèvement vaginal — comme le préconisent les auteurs japonais — nous a paru extrêmement difficile, malgré l'utilisation judicieuse de diverses substances antibiotiques.

Nous reviendrons plus loin sur cette importante constatation.

TECHNIQUE DE JENEY, 1958 (34)

— *Principe* :

L'auteur étudie l'action trichomonacide et trichomonastatique d'un grand nombre de produits parmi lesquels de nombreux colorants.

La méthode est fondée sur le principe suivant :

On réalise différentes dilutions de substances à essayer (1 % — 0,5 % — 0,1 % — 0,05 %) et on ajoute des quantités variables de ces dilutions (0,5 ml — 0,25 ml — 0,10 ml) à 5,5 ml du milieu de JOHNSON et TRUSSEL.

On ensemence alors chaque tube avec 0,1 ml d'une culture pure de 72 heures de *Trichomonas vaginalis*.

Après avoir laissé les tubes 72 heures à 37°C, on fait des contrôles microscopiques sur les tubes de l'essai ainsi que sur des tubes témoins.

La méthode de JENEY est donc une méthode classique d'inhibition au départ des cultures avec utilisation du milieu de JOHNSON et TRUSSEL et contrôle des résultats après un temps fixé à 72 heures.

3°) Essais sur milieux monophasiques solides :

MÉTHODE DE FILADORO ET ORSI (25)

Nous avons vu, au chapitre précédent, la description détaillée de ce milieu solide et dans quelles conditions les auteurs y cultivent les flagellés.

FILADORO et ORSI, en application de la méthode de diffusion dans l'agar pour la mesure de l'activité trichomonastatique, emploient une technique modifiée destinée à la détermination du pouvoir trichomonacide de la trichomycine dont nous donnons ici une brève description.

— *Technique* :

On répand à la surface d'une couche de base de milieu C.P.L.M. contenant 2 % d'agar une mince couche du même milieu contenant 1 % d'agar et ensemencé avec des flagellés.

L'antibiotique est dissous dans une solution tampon de phosphates à pH 6 et placé sur l'agar dans des godets de porcelaine.

On peut essayer ainsi des concentrations variées de substances en utilisant plusieurs godets pour chaque concentration.

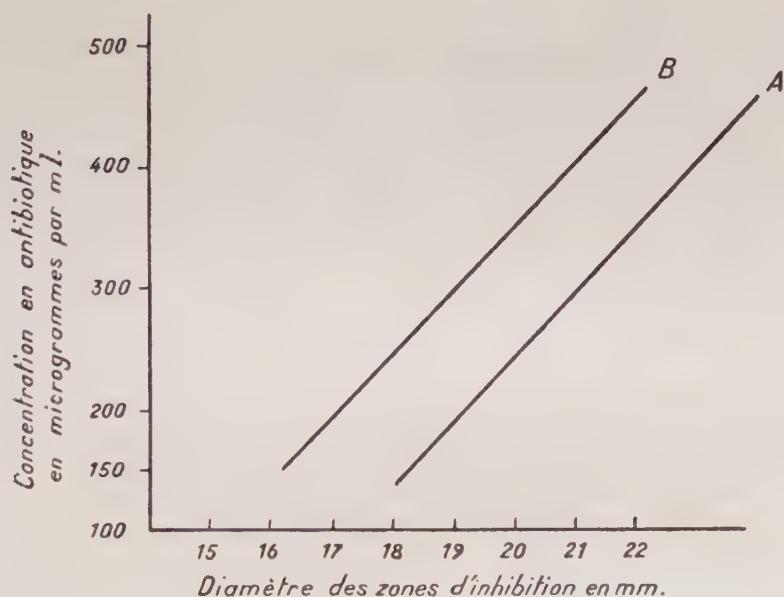
On mesure ensuite les zones d'inhibition qui apparaissent après 36 à 48 heures à 37°C dans une atmosphère de gaz carbonique.

Les valeurs moyennes des zones d'inhibition sont rapportées aux concentrations de substances exprimées en microgrammes par ml.

ACTIVITÉ TRICHOMONASTATIQUE DE DEUX ÉCHANTILLONS DE TRICHOMYCINE.

A. — Souche standard connue.

B. — Souche inconnue.



Comme on le voit sur la figure, il existe une parenté linéaire entre le témoin et les échantillons d'antibiotiques à tester lorsque la concentration se situe entre 150 et 500 microgrammes par ml. Les courbes sont alors parallèles.

Du rapport d'activité entre le témoin et l'échantillon, l'activité de ce dernier peut être ainsi calculée.

L'intérêt de cette méthode réside dans l'application des techniques de diffusion utilisées en bactériologie pour les études quantitatives sur les flagellés.

Cette méthode séduisante est cependant difficile à appliquer et l'obtention de cultures en nappe, dans les conditions indiquées par les auteurs, n'est pas toujours facilement réalisable, comme nous avons pu le constater au cours de nos essais.

B. - ESSAIS par CONTACT DIRECT ENTRE LAME et LAMELLE :
GUIGNARD (28) et JEAN-BAPTISTE (33) :

MÉTHODE DE GUIGNARD, 1949 (28)

En 1949, GUIGNARD décrit dans une thèse de doctorat en Médecine une méthode d'essai des antiamibiens fondée sur le contact direct, entre lame et lamelle, du protozaire et de la substance à essayer.

Cette technique présente l'avantage de ne pas être perturbée par les éléments des milieux de culture et permet de suivre facilement, jusqu'à leur mort, le comportement des amibes.

— *Principe :*

Il consiste à mettre les amibes en contact, entre lame et lamelle, avec une concentration déterminée de produit.

Les préparations sont maintenues à l'étuve de Foot à 37°C et des contrôles sont effectués à intervalles réguliers.

Dans ces conditions, la survie du témoin est de 6 à 7 heures. Ce temps est suffisant pour suivre les réactions des parasites mis en contact avec les diverses dilutions de la substance à étudier.

— *Technique appliquée aux amibes et expression des résultats.*

Une goutte de la solution de titre connu est déposée sur une lame et mélangée avec une goutte de la suspension d'amibes. Le taux de dilution se trouve ainsi dédoublé. On recouvre le tout d'une lamelle, on lute à la paraffine et on porte à l'étuve de Foot à 37°C.

Les contrôles sont effectués toutes les demi-heures comparativement à un essai témoin.

II. — ESSAIS D'ACTIVITÉ TRICHOMONASTATIQUE :

MÉTHODE DÉCRITE PAR SAVEL EN 1957 (67)

L'activité trichomonastatique peut être définie comme la dose minimum nécessaire pour suspendre la multiplication des flagellés sans altérer leur capacité de reproduction quand on les repique sur un milieu neuf.

— *Technique :*

On utilise une suspension de flagellés contenant environ 100 cellules par microlitre. Cette suspension est mise à l'étuve à 37°C pendant 48 heures en présence d'une concentration de substance variant entre 0,25 et 5 microgrammes par ml.

On effectue alors une nouvelle numération. Pour une certaine concentration de produit, comprise entre les doses limites employées, les parasites, dont le nombre reste constant, vont conserver une capacité de reproduction suffisante pour que la subculture sur un milieu neuf soit positive.

Après une incubation de deux jours à 37°C, cette culture doit présenter une prolifération comparable à celle fournie par un tube témoin.

TRAVAUX PERSONNELS

BUT DE NOS TRAVAUX

Le but de ce travail est essentiellement de proposer une ou plusieurs techniques utilisables en pratique courante permettant d'effectuer *in vitro*, rapidement et simplement, une sélection de substances supposées douées de propriétés trichomonacides.

Nous avons déjà mis l'accent, dans les chapitres précédents, sur les différents facteurs susceptibles de diminuer la valeur des techniques d'essai. La connaissance de ces notions était, à notre avis, nécessaire pour une bonne compréhension des problèmes qui vont se poser aux chercheurs désireux d'étudier les substances trichomonacides.

La possibilité de reproduire, dans le temps, les résultats d'essais obtenus avec une technique déterminée est fonction de la composition du milieu choisi, de l'importance de la flore associée, de la nature de la souche et de son âge.

Nous nous sommes efforcé, au cours de ces travaux, d'apporter quelques éclaircissements sur le rôle respectif joué par ces différents facteurs. L'étude comparative des résultats obtenus a montré, par exemple, qu'il était indispensable d'utiliser des souches bien acclimatées au milieu choisi et, par conséquent, suffisamment stabilisées.

Dans ces conditions, avec une technique appropriée, il est possible d'obtenir des résultats sensiblement voisins au cours du vieillissement d'une souche donnée ; mais, comme nous le verrons plus loin, il est alors nécessaire de limiter le développement des germes associés.

Il semble donc particulièrement intéressant de mettre en parallèle les résultats d'essais renouvelés à différents moments dans des conditions identiques. Cette méthode d'étude, qui ne semble pas avoir été retenue par nombre d'expérimentateurs, devrait permettre, à notre avis, d'apprécier plus sûrement la valeur d'une technique.

GÉNÉRALITÉS SUR LE CHOIX D'UNE TECHNIQUE D'ESSAI

1°) Choix d'une technique d'essai en tubes :

La technique que nous avons utilisée sera décrite en détails dans la suite de cet exposé. Certains essais en tubes sont destinés à déterminer la concentration minimum de substances susceptibles d'inhiber le développement d'une culture pure ou impure.

Parmi ceux-ci, nous avons donné la préférence aux méthodes fondées sur l'inhibition au départ des cultures.

Elles ont pour principe l'ensemencement d'un milieu contenant déjà la substance antiseptique ; après trois à quatre jours d'étuve à 37°C, on vérifie si la culture est positive ou négative. Les cultures apparemment négatives peuvent être contrôlées par une subculture sur un milieu neuf.

Ces méthodes nous semblent plus précises que celles dont le principe consiste à déterminer l'action léthale des substances sur des cultures de flagellés de quatre jours.

En effet, sur la plupart des milieux, une culture de quatre jours arrive à son maximum de développement et va commencer à décliner.

On y observe alors des formes peu mobiles dont le nombre va s'accroître rapidement à partir du cinquième jour et qui traduisent le vieillissement de la souche.

L'augmentation quantitative des germes, la prolifération de certaines espèces défavorisantes, et d'une façon générale, l'apparition dans le milieu de substances de déchets qui tendent à remplacer les éléments nutritifs déjà utilisés, semblent jouer un rôle déterminant dans l'accélération du processus de dégénérescence des flagellés.

Dans ces conditions, la substance toxique va exercer son action sur une souche déjà âgée et comportant des formes peu mobiles.

On conçoit qu'il devienne difficile, malgré l'utilisation d'un témoin, de dissocier l'action propre de la substance de celle qui résulte des processus de vieillissement.

Lors de quelques essais effectués dans les conditions précédentes, nous avons remarqué que le pourcentage des individus immobiles était, 48 heures après l'introduction de la substance inhibitrice, sensiblement le même dans les tubes témoins et dans ceux contenant des doses moyennes d'antiseptiques.

Les concentrations léthales étant, de toute façon, beaucoup plus élevées par cette méthode, il en résulte que la nécessité d'utiliser de telles doses pour obtenir la mort de la totalité des flagellés, 24 heures après l'introduction du toxique, jointe au fait que les témoins contiennent à ce moment un nombre plus ou moins important de formes peu mobiles, retire beaucoup d'intérêt à cette méthode d'essai.

*
**

Nous nous sommes efforcé également de simplifier les techniques de manière à rendre possibles les essais en série tout en obtenant une approximation suffisante.

Dans cet esprit, nous n'avons pas recherché une précision excessive portant sur certains points de détail — les méthodes biologiques ne permettant pas d'atteindre la précision du dosage chimique — mais nous avons préféré utiliser des procédés mettant en œuvre des milieux simples et bien standardisés.

Pour cette raison, nous avons cherché à éliminer, dans la mesure du possible, les éléments générateurs d'imprécisions plutôt que d'atténuer les conséquences de leur présence en compliquant la méthode et en multipliant les manipulations.

L'EXEMPLE SUIVANT PERMET D'ILLUSTRER CE POINT DE VUE :

Certains auteurs, qui proposent le milieu diphasique de l'Institut Pasteur pour les essais *in vitro*, ont montré qu'une certaine quantité de la substance testée était adsorbée sur le plan incliné protéique ; il s'ensuit une diminution de la concentration en substance active dans la phase liquide qui peut être à l'origine d'erreurs plus ou moins importantes.

Ces erreurs sont, en général, de l'ordre de 10 à 20 % et varient en fonction de la nature du produit étudié.

Pour remédier à cet inconvénient, il a été proposé de doser l'antiseptique dissous dans la phase liquide, après le développement des flagellés, par des microméthodes chimiques.

Malheureusement, toutes les substances trichomonacides ne peuvent être dosées de cette façon ; de plus, nous avons déjà insisté sur les inconvénients d'un procédé qui augmente considérablement la durée des manipulations et qui, de toute manière, ne permet de résoudre qu'un des problèmes en présence.

Quoi qu'il en soit, les essais comparatifs effectués à l'aide de ce milieu, avec ou sans plan incliné protéique, nous ont donné des résultats très voisins, les faibles différences observées pouvant s'expliquer aussi bien par l'absence de la phase solide que par la diminution de la concentration en substance dissoute dans la phase liquide.

Ces essais nous ayant montré qu'il était possible de se passer d'une phase solide, nous pouvons aussi préconiser l'utilisation de méthodes faisant usage de la seule phase liquide, ce qui exclut, du même coup, toute discussion à ce sujet.

Ainsi, nous nous sommes efforcé, non seulement de proposer une méthode simple et rapide, mais aussi de nous assurer, par des essais comparatifs, de l'importance réelle de chacun des éléments en présence.

Nous négligerons donc certains facteurs susceptibles d'introduire de faibles causes d'erreurs, compte tenu de la sensibilité générale de la technique, ce qui sera à l'avantage de sa simplification, but que nous recherchons tout particulièrement.

Cependant, on aura parfois avantage, comme nous l'avons dit précédemment, à supprimer l'élément pouvant introduire un certain pourcentage d'erreur. Ce but sera atteint en modifiant, soit le milieu de culture utilisé, soit la technique d'essai.

Les deux exemples suivants montrent encore combien il est intéressant, pour les conclusions que l'on peut en tirer, de faire varier certains constituants d'une méthode d'essai qu'on désire simplifier.

a) *Variation de la concentration en sérum sanguin :*

Nous avons dit que les flagellés ne pouvaient se développer dans un milieu privé de sérum sanguin. Les Parasitologues admettent tous ce fait et ils proposent, pour cultiver les parasites, des milieux dont la concentration en sérum varie de 5 à 20 %. Si l'on utilise pour les essais un milieu monophasique liquide, il semble préférable, *a priori*, d'utiliser un milieu peu riche en sérum sanguin, élément dont la constitution est fort complexe.

Les essais réalisés sur milieu de MAGARA nous ont montré que les *Trichomonas* pouvaient se développer dans un milieu renfermant seulement 1 % de sérum ; mais, dans ces conditions, ils sont beaucoup plus sensibles à l'action des antiseptiques.

En augmentant la concentration sérique, on remarque que, pour des pourcentages variant de 5 à 15 %, les souches considérées comme stables, prolifèrent aussi bien, quelle que soit la teneur du milieu en sérum ; de même, les essais effectués avec une même substance donnent des résultats très voisins si la concentration sérique varie dans les limites indiquées.

Les concentrations léthales semblent donc indépendantes des concentrations en sérum qui doivent, toutefois, être au moins égales à 5 %.

En conclusion, on peut admettre qu'il existe une concentration en sérum sanguin en dessous de laquelle les essais *in vitro* ne peuvent plus être effectués avec sécurité.

La concentration optimale se situe aux environs de cette concentration minimale utile. La conséquence directe de cette constatation est qu'il n'est pas nécessaire d'utiliser une concentration sérique élevée ; on évite ainsi d'introduire, en trop grande quantité, un élément dont les principes actifs n'ont pu être, jusqu'alors, parfaitement définis.

b) Variation du nombre des flagellés ensemencés :

L'exemple suivant montre qu'on retrouve cette notion de seuil lorsqu'on fait varier le nombre des *Trichomonas* ensemencés dans le milieu de culture.

A la suite d'essais comparatifs, nous avons pu établir qu'il n'était pas nécessaire de toujours ensemercer le même nombre de flagellés pour obtenir des résultats reproductibles, toutes les autres opérations de l'essai étant effectuées dans des conditions identiques.

C'est ainsi que nous avons obtenu des résultats similaires en ensemençant sur milieu de MAGARA un nombre de parasites variant de 100 000 à 5 000 000.

Cependant, si l'inoculum est peu riche en protozoaires, leur développement n'apparaît que tardivement, à condition toutefois que la concentration en substance toxique permette le départ de la culture.

Enfin, si l'inoculum contient un nombre de cellules très inférieur à 100 000, les flagellés ne se multiplient pas toujours dans les tubes témoins.

Ces constatations ont un double intérêt :

- Elles montrent qu'il n'est pas indispensable d'ensemencer un nombre très précis de *Trichomonas*, ce qui peut simplifier les opérations de numération et d'ajustage, toujours longues et délicates.
- Elles indiquent qu'il existe pour l'inoculum un certain seuil qu'on peut se permettre de dépasser très largement sans inconvénient, mais en dessous duquel il n'est plus possible de pratiquer l'essai d'une manière correcte.

Ces quelques exemples montrent l'intérêt que présente une étude minutieuse des différents éléments d'une technique d'essai qu'on veut simple et standardisée.

Nous concluons en rappelant que notre but n'a pas été seulement de choisir une technique d'essai pouvant donner des

résultats valables, mais aussi d'étudier les différents éléments de ces méthodes. Nous avons été ainsi amené à supprimer les facteurs les plus perturbateurs (flore associée, plan incliné sérrique) ; les autres ont été étudiés par des essais comparatifs qui nous ont permis de préciser leur importance (sérum, inoculum, nature et âge de la souche).

Si l'on tient compte de ces faits, les résultats des expériences deviennent reproductibles dans le temps et dépendent essentiellement de la nature de la souche et de la substance toxique, l'âge de la souche intervenant peu avec la technique et le milieu que nous proposerons (excepté, peut-être, pour les souches très âgées).

2°) Choix d'une technique d'essai sur lame :

Nous avons déjà dit que ces techniques d'essais consistaient dans la mise en contact des flagellés avec des concentrations variables de produit.

Nous reviendrons plus loin sur les détails de la technique choisie. L'utilisation de cellules de NAGEOTTE s'est avérée bien supérieure au contact direct entre lame et lamelle et a permis la numération éventuelle des flagellés.

Comme pour les essais en tubes, nous avons multiplié les expériences et avons comparé les résultats obtenus dans le temps.

Malheureusement, ces méthodes se sont révélées, en général, moins précises que les précédentes, et les résultats imparfaitement reproductibles. De plus nous avons parfois observé, pour une même substance, des différences d'activité considérables par rapport aux essais en tubes.

Cependant, les nombreux tests en cellules que nous avons pratiqués nous ont permis d'apporter quelques précisions sur certaines données et des observations intéressantes ont pu être faites.

Ces quelques généralités ayant défini le but et l'esprit de ce travail, nous présentons ci-dessous un plan d'ensemble des différents chapitres que nous allons exposer.

Chapitre I : *Les milieux utilisés* pour l'entretien de nos souches et pour les essais *in vitro* avec les détails de leur préparation telle qu'elle a été effectuée au laboratoire.

Chapitre II : *Etude des souches.*

- Origine de nos souches (souches récentes, souches âgées),
- Prélèvement des flagellés,
- Méthodes utilisées pour l'examen des parasites (examen direct, fond noir, et colorations),
- Le problème du *lancement* d'une souche (difficulté et durée du lancement d'une souche, cas des différents milieux utilisés, usage des antibiotiques),
- Comportement des flagellés sur les milieux utilisés.

Chapitre III : *Les substances essayées.*

- Description sommaire des propriétés chimiques de chaque substance utilisée,
- Leur rôle : permettre la mise au point des essais,
- Conclusion : nous proposerons, à la fin de ce travail, une de ces substances comme étalon.

Chapitre IV : *Les essais en tubes.*

A. — *Description détaillée de la technique utilisée.*

- 1°) Généralités : considérations générales sur le choix d'une technique d'essai.
- 2°) Principe de la technique d'essai.
- 3°) Description détaillée de la technique d'essai.
 - a) Première étape : dilution de la substance à essayer et introduction de la quantité calculée dans les tubes de culture.
 - b) Deuxième étape : ensemencement des milieux avec un nombre déterminé de flagellés.
 - c) Troisième étape : incubation à 37°C de tous les milieux ensemencés.

B. — *Résultats obtenus.*

- 1°) Expression des résultats des essais.
- 2°) Résultats des essais effectués sur les différents milieux :
 - Discussion des résultats,
 - Interprétation générale des essais d'activité trichomonacide en tubes,
 - Choix d'une substance trichomonacide de référence.

Chapitre V : *Les essais en cellules.*A. — *Description détaillée des techniques utilisées.*

- 1°) Principe général de ces méthodes.
- 2°) Inconvénient des essais par contact direct entre lame et lamelle.
- 3°) Avantages des essais en cellules.
- 4°) Techniques employées :
 - a) Première technique : description et établissement des courbes de résultats.
 - b) Deuxième technique :
 - *Première étape* : dilution de la substance à essayer et répartition sur les cellules.
 - *Deuxième étape* : préparation de suspension de Trichomonas et répartition sur les cellules.
 - *Troisième étape* : mise en route de l'essai et examen horaire pendant six heures. Expression des résultats.

B. — *Résultats obtenus.*

- 1°) Etude comparative des résultats.
- 2°) Discussion et critique des essais en cellules.

Conclusion : — Résumé des observations personnelles relatées dans la première partie,

- Rappel des techniques utilisées, et avantages qu'elles nous semblent comporter, compte tenu des résultats obtenus.
- Intérêt des essais en tubes, application de la méthode aux substances insolubles,
- Inconvénients des essais en cellule de NAGEOTTE.

CHAPITRE PREMIER

MILIEUX UTILISÉS POUR L'ENTRETIEN DE NOS SOUCHES ET POUR LES ESSAIS IN VITRO

Les milieux que nous avons choisis permettent l'entretien prolongé des cultures de flagellés. Ils ont tous été utilisés dans nos expériences pour la mise en culture de souches jeunes et de souches anciennes, ce qui a permis de comparer les résultats obtenus et d'en tirer des conclusions.

Nous nous sommes limité à l'utilisation de quatre milieux classiques, de conception différente, auxquels nous avons parfois apporté de légères modifications.

a) *Le milieu diphasique N de l'Institut Pasteur :*

Nous l'avons constamment employé tant pour l'entretien des souches que pour les essais. Il ne nous a pas permis l'obtention de cultures amicrobiennes.

b) *Le milieu monophasique de JOHNSON et TRUSSEL, dit milieu C.P.L.M. :*

Il nous a servi principalement pour des essais en phase liquide.

c) *Le milieu monophasique au thioglycollate :*

Ce milieu, de préparation plus rapide que le précédent, a été utilisé pour les mêmes essais.

d) *Le milieu de MAGARA :*

Il s'est révélé aussi favorable pour l'entretien des souches que pour les essais.

Son intérêt principal réside dans la possibilité d'obtenir des souches bien vivaces rigoureusement pures.

Ces milieux ont déjà été mentionnés dans la première partie de cet exposé ; il convient maintenant de décrire en détail leur préparation telle qu'elle a été effectuée au laboratoire.

MILIEU N DE L'INSTITUT PASTEUR :

Il comporte :

- une phase solide : sérum coagulé en position inclinée.
- une phase liquide : liquide de RINGER, bicarbonaté et additionné de 15 % de sérum de cheval stérile,
- un élément figuré : l'amidon de riz.

1°) Préparation du matériel à utiliser :

L'importance du matériel à préparer est fonction du nombre de tubes qu'on doit utiliser dans un délai de deux mois environ.

Sur la base de deux cents tubes de culture, nous rassemblons :

- a) 200 tubes à essais de 17 mm de diamètre en verre Pyrex de préférence.
- b) une dizaine d'erlenmeyers de 125 ml et une quinzaine de 250 ml.
- c) une vingtaine de tubes à hémolyse.
- d) de nombreuses pipettes Pasteur de 25 cm de longueur.
- e) un ou deux containers métalliques contenant un certain nombre de pipettes bouchées au coton de 1 ml, 5 ml, 10 ml et 20 ml.

Toutes ces pièces seront soigneusement obturées au coton et stérilisées au four pendant une heure à 180°C.

Le matériel destiné à la filtration du sérum sera enveloppé et stérilisé par autoclavage.

2°) Eléments de base à préparer d'avance :

Les éléments suivants, de longue conservation, peuvent être préparés d'avance, en quantité suffisante, pour assurer la fabrication de plusieurs séries de tubes de culture.

Ce sont :

a) *solution-mère du liquide de Ringer, de composition suivante :*

— ClNa	60 g
— ClK	1 g
— Cl ₂ Ca	1 g
— Eau distillée q.s.p.	1 000 ml

Cette solution, conservée en flacons de 1 litre, est stérilisée à l'autoclave 15 minutes à 120°C.

Elle sert à préparer, par dilution au dixième, le liquide de RINGER. On peut la conserver environ un an au réfrigérateur à + 4°C.

b) ampoules de bicarbonate de sodium :

Le bicarbonate ne pouvant être introduit avec les autres éléments (réaction avec Cl_2Ca et décomposition au cours de l'autoclavage avec libération de CO_2), on préparera un certain nombre d'ampoules de 5 ml contenant une solution à 0,2 % du produit, c'est-à-dire 1 cg de bicarbonate par ampoule. Ces ampoules, remplies aux 2/3 et scellées, seront ensuite autoclavées pendant vingt minutes à 115°C.

Le CO_2 libéré au cours du chauffage se recombine pendant le refroidissement.

c) tubes à hémolyse :

Dans lesquels on aura réparti de l'amidon de riz à raison d'environ un gramme par tube (ce qui correspond à une hauteur de 2,5 cm).

Ces tubes, bouchés au coton et soigneusement enveloppés, sont ensuite stérilisés par chauffage au four à 140°C pendant une heure, trois jours de suite. Un grand nombre de tubes peut être ainsi préparé d'avance.

3°) Obtention du sérum de cheval stérile :

La nécessité de disposer d'une assez grande quantité de sérum stérile pose deux problèmes d'ordre pratique :

- a) celui de l'obtention d'un sérum privé d'hématies,
- b) celui de sa stérilisation.

Obtention du sérum :

Nous avons pu obtenir, sans difficulté, aux Abattoirs de Vaugirard, des quantités variant de un litre à deux litres de sang frais ou de sérum de cheval provenant de la décantation d'un sang coagulé.

Le sang recueilli dans des récipients de un litre très propres est placé à la glacière pendant 24 heures.

Le caillot formé est décollé à l'aide d'un agitateur de verre ; le sérum est ensuite décanté, mais il est nécessaire de le centrifuger pour le débarrasser des hématies qui colmatent rapidement l'appareil de filtration.

Nous avons utilisé, à cet effet, une centrifugeuse à très grande vitesse munie d'un dispositif de refroidissement par circulation d'eau froide et permettant la centrifugation d'environ un litre de sérum.

Stérilisation du sérum par filtration :

Nous avons utilisé deux procédés de filtration différents :

Le procédé le plus courant est celui qui fait usage de bougies de Chamberland du type L3. Ces bougies, ainsi que le matériel destiné à recevoir le sérum, doivent être préalablement stérilisées.

Les opérations de nettoyage et de régénération des bougies étant longues et délicates, nous avons été amené à abandonner ce procédé au profit de l'utilisation d'un appareil muni de disques filtrants Seitz.

L'appareil utilisé est constitué de deux parties métalliques entre lesquelles se trouve serré, grâce à des écrous à ailettes, un disque filtrant.

La partie supérieure reçoit le sérum qui s'écoule, après filtration, dans un erlenmeyer stérile de deux litres relié à une trompe à eau.

Tout l'appareil, y compris le récipient où se fait l'aspiration, est stérilisé à l'autoclave à la pression de 1,5 atmosphère pendant 20 minutes.

La filtration est réalisée, soit sous pression (en reliant une pompe à air à la partie supérieure contenant le sérum à filtrer), soit par aspiration au moyen du vide.

La filtration commence à basse pression et, si cela est nécessaire, la pression peut être portée à 2 atmosphères.

L'usage de cet appareil n'est pas sans inconvénients. Citons, en particulier, la lenteur de la filtration par suite d'un rapide colmatage du filtre et la formation de mousses qui envahissent rapidement l'erlenmeyer si l'on ne règle pas convenablement l'aspiration (*).

Après deux à trois heures de filtration, on recueille environ un litre de sérum qui est réparti stérilement par versement direct dans une série d'erlenmeyers de 125 ml.

On vérifie la stérilité du sérum en abandonnant ces récipients à l'étuve à 37°C pendant 24 heures.

Seuls les sérums parfaitement limpides seront utilisés pour la préparation du milieu et conservés ainsi quelques jours à la glacière.

La description de cette méthode de filtration montre qu'il est relativement long d'obtenir du sérum stérile en assez grande quantité. Une solution de facilité consiste à utiliser les ampoules-bouteilles de 50 ml fournies par l'Institut Pasteur et qui contiennent du sérum de cheval stérile.

(*) Nous avons obtenu une filtration plus rapide en faisant précéder la filtration stérilisante d'une pré-filtration du sérum sur une plaque filtrante plus grossière.

4°) Préparation des supports de sérum coagulé :

La répartition du sérum coagulé dans les tubes à essais peut s'effectuer, soit par l'emploi d'une boule de MIQUEL stérile qui permet de prendre d'un seul coup une plus grande quantité de sérum et d'éviter ainsi des prélèvements successifs qui augmentent les chances de contamination, soit en utilisant un rhéomètre calibré stérile relié au milieu par un tube aspirateur, soit en versant directement le sérum des erlenmeyers dans les tubes après flambage des ouvertures.

Ces derniers procédés ont l'avantage d'être rapides et de procurer un minimum de risques de pollution.

On répartit ainsi le sérum à raison de 2 ml environ par tube, ce qui limite la surface du plan incliné.

Les tubes sont alors placés pendant vingt minutes à 75°C dans un coagulateur dont l'inclinaison a été réglée au préalable.

Le sérum doit avoir, au sortir de l'appareil, une teinte blanc ivoire ; cependant, nous avons remarqué que les sérums légèrement hémolysés donnaient aussi de très bons résultats.

5°) Confection de la phase liquide et réunion des deux phases :

On prépare la solution de RINGER par dilution au dixième de la solution-mère et on la répartit dans les erlenmeyers stériles de 250 ml à raison de 95 ml de solution par récipient.

On stérilise ensuite à l'autoclave pendant vingt minutes à 120°C, puis on ajoute aseptiquement une ampoule de bicarbonate, le contenu d'un tube à hémolyse d'amidon et enfin 15 ml de sérum dans chaque flacon. Il ne reste plus qu'à répartir la phase liquide dans les tubes de sérum coagulé après flambage des ouvertures.

Cette opération est facilitée par l'utilisation de pipettes stériles de 20 ml avec lesquelles on versera 5 ml de liquide dans chacun des tubes (cette quantité est suffisante pour recouvrir en totalité le plan incliné protéique).

La répartition peut être aussi effectuée à l'aide d'un rhéomètre stérile.

Les milieux ainsi terminés sont contrôlés bactériologiquement par ensemencement sur du bouillon nutritif et sur milieu au thioglycollate.

D'autre part, les tubes de culture doivent demeurer parfaitement limpides après un séjour de 48 heures à l'étuve à 37°C.

On peut alors les conserver au réfrigérateur à + 4°C pendant environ deux mois.

CONDUITE DES CULTURES SUR LE MILIEU N

a) *Ensemencement du produit pathologique :*

Pour ensemer un prélèvement de produit pathologique sur le milieu N, il suffit d'agiter légèrement l'écouvillon ayant servi au prélèvement à la surface de la phase liquide.

Le développement microbien étant abondant au début, il est nécessaire de limiter cette prolifération par l'usage d'antibiotiques en qualité modérée et par de fréquents repiquages qui seront, par la suite, espacés jusqu'au moment où le rythme normal sera atteint. Il est, en général, de trois à quatre jours, mais peut varier suivant les souches.

b) *Pratique des contrôles et des repiquages :*

Ces deux opérations se font simultanément. On utilise à cet effet une pipette Pasteur ajustée à un tube de Helmholtz ; ce dispositif, d'usage courant en Parasitologie, est nécessaire pour contrôler le prélèvement.

Après avoir passé soigneusement dans la flamme l'ouverture des tubes et l'extrémité de la pipette, cette dernière est introduite dans le tube contenant la culture de flagellés. On aspire alors quelques gouttes de liquide à la limite du dépôt d'amidon et du sérum coagulé en ayant soin d'effleurer légèrement cette surface. C'est à cet endroit, en effet, que se multiplient les flagellés qui trouvent dans l'amidon de riz un élément nécessaire à leur développement.

La première goutte sera déposée sur une lame pour le contrôle de la mobilité des protozoaires, et les trois suivantes à la surface de la phase liquide du milieu neuf.

En prenant ces précautions, il est possible d'entretenir une souche sur ce milieu pendant plusieurs années.

Les trichomonas étant adaptés à leur flore bactérienne associée, il est nécessaire d'opérer dans des conditions de stérilité parfaite pour éviter toute souillure de la souche par un germe extérieur.

MILIEU C.P.L.M. DE JOHNSON ET TRUSSEL :

1°) *Composition du milieu C.P.L.M. :*

Bactopeptone Difco	32,0 g
Bactoagar Difco	1,6 g
Cystéine CIH	2,4 g
Maltose	1,6 g
Infusion de foie Difco	320,0 ml
Solution de RINGER	960,0 ml
Bleu de méthylène (à 0,5 %)	0,7 ml
Sérum humain : 2 ml pour 8 ml de milieu	

2°) Technique de la préparation :

On prépare tout d'abord l'infusion de foie en faisant infuser 50 à 75 grammes d'extrait de foie Difco dans un litre d'eau distillée.

Pratiquement, on dépose l'extrait de foie dans une capsule de deux litres et on y ajoute un litre d'eau mesuré à l'éprouvette.

On maintient la température à 50°C pendant une heure en agitant fréquemment, puis on élève la température à 80°C pendant cinq minutes afin de provoquer la coagulation d'une fraction des protéines.

On procède ensuite à la filtration sur une éprouvette graduée de 500 ml et on recueille 320 ml de filtrat.

On ajoute à l'infusion de foie les autres ingrédients préalablement dissous dans la solution de Ringer et en dernier lieu 0,7 ml de la solution de bleu de méthylène.

Le pH est ajusté aux environs de 5,8 - 6 en alcalinisant par la soude N ajoutée goutte à goutte et la solution est répartie à raison de 8 ml par tube. On stérilise à l'autoclave à 120°C pendant vingt minutes.

Après refroidissement, on ajoute aseptiquement 2 ml de sérum de cheval stérile à chaque tube.

On effectue les contrôles bactériologiques des tubes terminés comme il a été dit précédemment.

La composition du milieu C.P.L.M. permet l'obtention d'une anaérobiose relative et, par voie de conséquence, l'élimination des germes aérobies.

Cependant, dans la pratique, il s'avère très difficile d'obtenir des cultures pures avec ce milieu sans y ajouter un antibiotique ; aussi avons-nous incorporé à chacun des tubes environ 5 000 unités de pénicilline cristallisée, ce qui nous a permis d'obtenir des cultures pratiquement amicrobiennes.

On prépare donc une solution concentrée de pénicilline en dissolvant aseptiquement 1 million d'unités de cet antibiotique dans 10 ml de milieu. Après dissolution, on ajoute 2 à 3 gouttes de cette solution à chaque tube de culture.

Les repiquages sont effectués sur ce milieu tous les deux à quatre jours.

MILIEU AU THIOGLYCOLLATE :

Fourni par les Laboratoires Difco, il répond à la formule :

Bactocaséine	15,00 g
Bacto (Yeart)	5,00 g
Bacto-dextrose	5,00 g
Chlorure de sodium	2,40 g
L-cystine Difco	0,75 g
Acide thioglycollique	0,30 ml
Bactoagar	0,75 g
Resazurin	0,001 g

Cette poudre, très hygroscopique, doit être maintenue dans des flacons bien bouchés placés à la glacière.

Pour réhydrater le milieu, on opère de la manière suivante :

On pèse 29,50 g de poudre dans une capsule de porcelaine de grande taille, on y ajoute un litre d'eau distillée mesurée à l'éprouvette, on chauffe ensuite à l'ébullition jusqu'à dissolution complète du milieu.

La solution est alors versée dans les erlenmeyers de 250 ml qu'on stérilise à l'autoclave à 120°C pendant vingt minutes.

On répartit, après refroidissement, à raison de 8 ml par tube de culture et on termine en ajoutant stérilement à chacun des tubes 2 ml de sérum de cheval stérile.

Les milieux sont ensuite conservés à l'obscurité à une température de + 10° à + 15°C.

La partie supérieure du milieu ne doit pas virer au rose sur une hauteur notable, ce qui se produit lorsqu'une trop grande quantité d'oxygène a été absorbée.

On peut, dans ce cas, rénover les milieux en les plaçant au bain-marie bouillant pendant quelques minutes, ce qui permet de chasser l'oxygène.

Pour obtenir des cultures pures avec le milieu au thioglycollate, il suffit d'y ajouter de la pénicilline dans les conditions indiquées précédemment.

MILIEU DE MAGARA, AMINO, YOKOUTI :

Ce milieu permet l'obtention de souches rigoureusement pures par la double action de l'anaérobiose et des antibiotiques.

1°) Composition du milieu :

Il est essentiellement constitué par du bouillon V.F. pour anaérobies glucosé à 0,5 % et additionné de 10 % de sérum humain ou de sérum de cheval stérile.

2°) Préparation du matériel utilisé :

Pour chaque série de milieu préparé, on rassemble :

- environ 100 tubes de Hall. Ces tubes, qui comportent un étranglement obturé par une bille de verre, sont soigneusement bouchés au coton ;
- 10 à 12 erlenmeyers de 250 ml bouchés au coton ;
- pipettes de 10 et de 20 ml.

Ce matériel est stérilisé au four pendant une heure à 180°C.

3°) Éléments de base du milieu :

a) *Bouillon V.F. pour anaérobies* (milieu de WEINBERG et GOY) :

Ce milieu, délivré par l'Institut Pasteur en flacons scellés de 500 ml, est constitué par du bouillon de viande et de foie de bœuf ; on l'utilise en bactériologie pour la culture des germes anaérobies.

b) *Sérum de cheval stérile* :

Il a été stérilisé et réparti comme nous l'avons vu précédemment. On utilisera donc, soit les erlenmeyers contenant le sérum stérile, soit les ampoules-bouteilles de 50 ml de l'Institut Pasteur.

c) *Ampoules de sérum glucosé hypertonique de 2 ml* :

La solution hypertonique de glucose étant à 30 %, chacune de ces ampoules contiendra 0,60 g de glucose.

De telles ampoules sont fournies par différents laboratoires pharmaceutiques, elles facilitent l'introduction du glucose stérile dans le milieu.

d) *Solution-mère de pénicilline* :

On fait dissoudre aseptiquement 1 million d'unités de pénicilline dans 10 ml de milieu V.F. pour anaérobies ; 1 ml contient donc 100 000 unités de pénicilline.

4°) Préparation du milieu :

On commence par répartir le bouillon V.F. dans les erlenmeyers préalablement jaugés à raison de 100 ml par erlenmeyer.

On opère par versement direct après passage à la flamme des ouvertures.

On ajoute ensuite, à la pipette stérile, 10 ml de sérum de cheval par récipient.

Si on utilise les ampoules-bouteilles de sérum, on devra, au préalable, en verser le contenu aseptiquement dans des flacons stériles. Il sera alors aisé de le répartir à la pipette.

On introduit alors stérilement dans chacun des erlenmeyers 0,50 g de glucose ; cette opération est simplifiée par l'utilisation des ampoules de sérum glucosé hypertonique de 2 ml.

Après avoir limé et flambé les pointes de ces ampoules, on verse environ 1,60 ml de leur contenu dans chacun des flacons, ce qui correspond sensiblement à 0,50 g de glucose pour 100 ml de bouillon V.F.

On répartit finalement la pénicilline à raison de 1 ml de solution-mère par flacon, la concentration en antibiotique par tube sera alors d'environ 10 000 unités Oxford (pour 10 ml de milieu).

Dans la majorité des cas, l'usage de la pénicilline suffit pour purifier une souche ; cependant, il est parfois nécessaire d'utiliser une association de pénicilline et de streptomycine.

La quantité de streptomycine à dissoudre dans la solution de pénicilline est alors de 0,10 pour 10 ml.

Le pH du milieu de Magara doit être ajusté à environ 5,4.

On procède à la répartition en tubes de Hall par versement direct, ou en utilisant un rhéomètre, en prenant soin de passer à la flamme toutes les ouvertures.

Le niveau du milieu doit dépasser de 1 cm la bille de verre pour compenser, au besoin, les pertes de liquide.

La répartition se fera à la pipette stérile ou au rhéomètre pour les tubes dosés destinés aux essais.

La stérilité des tubes est contrôlée par passage à l'étuve et par ensemencements sur les milieux courants : bouillon, gélose au sang et milieu au thioglycollate.

Les tubes de milieu de Magara peuvent être conservés au réfrigérateur à + 4°C pendant environ deux mois.

5°) Conduite des cultures sur le milieu de Magara :

Pour l'isolement d'une souche, on utilise des tubes contenant des antibiotiques jusqu'au 10° ou 12° repiquage.

La souche peut être alors considérée comme bactériologiquement pure, ce qui est vérifié par ensemencements sur les milieux bactériologiques courants et par des colorations par la méthode de Gram.

Les flagellés se rassemblent dans le fond des tubes pour former un petit dépôt blanchâtre bien visible à l'œil nu.

Ils sont isolés ou en amas, prennent une forme arrondie, mais restent très mobiles.

Les repiquages répétés tous les deux à sept jours sont effectués dans les conditions déjà décrites pour le milieu N de l'Institut Pasteur.

Les pipettes Pasteur montées sur des tubes de Helmotz doivent avoir des extrémités longues et d'une finesse régulière. On les introduit dans les tubes de culture maintenus fortement inclinés.

Les billes de verre reposant ainsi sur la paroi du tube, il est facile de faire passer l'extrémité effilée de la pipette jusqu'au fond et d'y aspirer 2 à 3 dixièmes de ml de suspension de *Trichomonas* qu'on introduira sous la bille de verre du tube neuf.

Une goutte de la suspension sera déposée, au préalable, sur une lame pour le contrôle de la vitalité des parasites.

Ce milieu nous a permis d'entretenir des souches de flagellés parfaitement acclimatées pendant des durées supérieures à un an.

CHAPITRE II

ÉTUDE DES SOUCHES DE TRICHOMONAS

GÉNÉRALITÉS : IMPORTANCE DANS LE CADRE DE CES TRAVAUX DE LA NATURE ET DE L'ÂGE DES SOUCHES :

Il nous a paru nécessaire, avant d'aborder la description détaillée des techniques et de commenter nos résultats, d'étudier brièvement les différents problèmes qui se rattachent aux souches de *Trichomonas*.

Nous avons vu que la standardisation d'une méthode est fonction de la nature de la souche et de son âge.

Nous avons été ainsi amené à comparer les résultats d'essais effectués à plusieurs mois d'intervalle sur des souches de même origine et ayant par conséquent vieilli.

D'une manière générale, les flagellés, qui se multiplient sur des milieux usuels accompagnés de leur flore associée, voient leur résistance vis-à-vis des substances toxiques se renforcer avec le temps.

Cependant, comme nous le verrons plus loin, si on cultive les *Trichomonas* à l'état pur sur le milieu de Magara, les différences de résistance se révèlent très faibles quelle que soit la sensibilité initiale de la souche par rapport au produit étudié.

On comprend l'intérêt de cette constatation, la valeur des essais *in vitro* étant, pour une grande part, fondée sur la reproductibilité des résultats obtenus à de grands intervalles de temps.

Il devient donc possible de procéder à l'étude de substances d'activité trichomonacide inconnue en utilisant une même souche de *Trichomonas* qui sera entretenue, d'une manière indéfinie, sur un milieu monophasique le permettant, tel le milieu de Magara.

Des essais comparatifs effectués avec une substance étalon, préalablement contrôlée par rapport à cette souche, rendront possible l'évaluation de faibles variations de résistance de la souche, toujours possibles.

Si le problème de la stabilisation d'une souche semble ainsi pouvoir se résoudre par l'emploi d'une technique et d'un milieu

appropriés, il convient maintenant d'attirer l'attention sur la forte individualité que présente chaque souche de *Trichomonas*. Nous verrons, en effet, que certaines souches peuvent être dix fois plus résistantes que d'autres et que cette différence persiste très longtemps.

Il résulte de ces observations qu'une substance d'activité inconnue devra toujours être étudiée comparativement à une substance étalon dont l'activité trichomonacide aura été déterminée à l'origine par rapport à cette même souche de flagellés.

Pour que les résultats soient comparables, on utilisera dans tous les cas une technique et un milieu de culture identiques, choisis pour permettre une stabilité suffisante de la souche au cours de son vieillissement.

Ces quelques généralités montrent combien il est important d'inclure, dans le cadre de ce travail, une étude comparative de souches d'origines variées et d'âges différents.

Cette nécessité nous obligera à utiliser différentes souches qu'il sera nécessaire d'entretenir pendant de longues durées.

Le problème de l'entretien des souches est, comme on le voit, de première importance, mais il se trouve pratiquement résolu lorsque la souche est bien acclimatée ; c'est donc au problème du *lancement* des souches de *Trichomonas* sur les différents milieux que nous nous attacherons dans ce chapitre.

Auparavant, nous décrirons très brièvement les méthodes utilisées pour le prélèvement des parasites ainsi que les procédés que nous avons employés pour les mettre en évidence.

I. — PRÉLÈVEMENT DES FLAGELLÉS.

Il se fait très simplement, de la manière suivante :

Après introduction dans la cavité vaginale d'un speculum non lubrifié, on effectue, à l'aide de tampons de coton stérile, deux ou trois prélèvements au niveau du cul-de-sac postérieur.

L'un de ces tampons servira à l'ensemencement des parasites sur le milieu choisi par simple agitation à la surface de la phase liquide.

Ce tampon sera ensuite pressé sur une lame, et la préparation examinée au microscope, entre lame et lamelle, à l'aide d'un objectif de moyen grossissement.

Un autre tampon pourra être utilisé éventuellement pour la confection de frottis.

II. — MÉTHODES D'EXAMEN DES FLAGELLÉS.

a) *Contrôle direct de la mobilité des flagellés par examen de la préparation à l'état frais entre lame et lamelle :*

C'est le procédé que nous avons le plus couramment utilisé.

b) *Utilisation d'un dispositif ultra-microscopique :*

L'examen sur fond noir des préparations peu riches en formes mobiles nous a permis de retrouver des parasites qui se présentent comme des éléments brillants et mobiles, faciles à distinguer sur le fond noir de la préparation.

c) *Confection de frottis :*

L'utilisation des frottis est justifiée par les avantages qu'ils présentent. Citons entre autres : la permanence du matériel qui permet l'examen répété des cellules fixées et le contrôle des caractères diagnostiques des éléments cellulaires (nombre de flagelles, longueur de la membrane ondulante).

La confection de frottis est à conseiller lors du *lancement* d'une nouvelle souche de *Trichomonas* dans le but de s'assurer de son identité.

L'opération la plus délicate réside dans la fixation des flagellés sur la lame ; en effet, bon nombre d'éléments vont se détacher du frottis pendant les différentes étapes de la coloration. La technique de fixation suivante donne des résultats satisfaisants à condition d'opérer sur un prélèvement suffisamment riche en protozoaires :

On place à l'extrémité d'une lame parfaitement dégraissée une goutte de la suspension de *Trichomonas* et une très petite goutte de sang frais, on mélange rapidement avec un vaccinostyle et on effectue ensuite le frottis dans les conditions habituelles. La fixation est réalisée par un contact de 5 à 6 minutes dans l'alcool-éther.

Plusieurs méthodes de colorations peuvent être proposées.

Nous avons utilisé, entre autres, la méthode de MAY-GRÜNWALD GIEMSA qui permet une bonne coloration des flagelles et de la membrane ondulante.

Il est toutefois nécessaire de prolonger le temps de contact du colorant de GIEMSA (environ 40 minutes de contact).

De bons résultats ont été également obtenus avec la méthode de HARRIS-SHORR que nous utilisons couramment pour l'étude des frottis vaginaux.

Récemment, R. de ROM et R. DEMOL (63 bis) ont montré l'intérêt du frottis vaginal coloré selon PAPANICOLAOU ou HARRIS-SHORR ; cependant, ils admettent que cette coloration n'a pas donné, au point de vue de l'exactitude du diagnostic, des résultats supérieurs à ceux de l'examen direct au microscope à fond noir.

III. — PROBLÈME DE L'ADAPTATION DES SOUCHES A UN MILIEU DÉTERMINÉ.

Au cours de ces travaux, nous avons entretenu un certain nombre de souches sur différents milieux. Parmi celles-ci, seule,

la souche dénommée S 1 nous a été fournie, au début de nos recherches, bien acclimatée sur le milieu diphasique de l'Institut Pasteur. Elle avait, à cette époque, environ cinq années d'âge et nous avons pu la conserver pendant plusieurs années.

Plusieurs autres souches nous ont été confiées par la Faculté de Pharmacie de Paris dès leur prélèvement ; d'autres, enfin, ont été prélevées par nous-mêmes dans notre laboratoire personnel.

Il nous a fallu ensuite chercher à acclimater les souches *neuves* sur les milieux choisis.

Le *lancement* des souches de flagellés s'est avéré particulièrement délicat sur certains milieux et malgré une certaine expérience dans ce domaine nous avons enregistré de nombreux échecs ; aussi, nous paraît-il utile de nous étendre un peu sur cet important problème.

Que faut-il entendre tout d'abord par *lancement* d'une souche ?

Ce terme ignoré du Directeur de Laboratoire d'Analyses Médicales, pour qui l'apparition des flagellés sur le milieu ensemencé constitue le terme de son travail, prend, dans le domaine de la recherche, un sens particulier.

Il s'agit, en l'occurrence, non seulement d'adapter à un milieu déterminé des flagellés se multipliant, soit *in vivo*, soit *in vitro* sur un milieu de culture différent, mais aussi de leur conférer une stabilité suffisante qui permettra un entretien quasi indéfini de la souche.

Une certaine harmonie doit donc s'établir assez rapidement entre le parasite et le milieu de culture. Malheureusement, on remarque que des souches différentes, cultivées exactement dans les mêmes conditions, peuvent avoir des comportements différents.

Les unes, malgré tous les efforts de l'opérateur, périssent et meurent, d'autres s'acclimatent définitivement après quelques repiquages sur le milieu choisi, mais le plus souvent, et pendant une durée qui peut être de plusieurs mois, il y a « *des hauts et des bas* ».

C'est ainsi que la souche pourra, à un moment donné, se montrer particulièrement florissante, puis périr rapidement sans raison apparente. Nous verrons plus loin quels soins particuliers l'on doit prendre lorsqu'une souche présente de telles oscillations.

On voit que les échecs n'ont pas toujours pour origine l'utilisation d'un milieu de culture peu favorable, mais qu'ils sont très souvent inhérents à la nature même de la souche.

Ajoutons, et c'est un point sur lequel nous insistons particulièrement, qu'une souche ne peut être considérée comme acclimatée sur un milieu déterminé qu'après une période de stabilité parfaite d'environ 2 à 3 mois, ce qui équivaut sensiblement à 20 à 30 repiquages.

Il est absolument déconseillé d'effectuer des essais *in vitro* sur une souche ne répondant pas à ces conditions et la plupart des échecs enregistrés par les auteurs proviennent, à notre avis, d'une utilisation trop hâtive des souches de flagellés.

Quelles sont les conditions requises et les règles à observer pour adapter une souche de flagellés à un milieu de culture ?

Nous distinguerons les cas suivants :

a) *Cas des souches difficiles ou impossibles à acclimater :*

Rappelons tout d'abord que certaines souches ne peuvent pas être acclimatées sur un milieu de culture, si favorable soit-il.

Les échecs semblent inhérents à la nature même de la souche, à la faible vitalité des parasites et, dans certains cas, à la composition de la flore associée et au développement qu'elle peut prendre après son transfert *in vitro*.

C'est ainsi qu'un envahissement rapide du milieu, dès le premier transfert, par le bacille Subtilis est fortement préjudiciable à la multiplication des flagellés. Il est parfois impossible de l'éviter malgré l'utilisation des antibiotiques.

Par contre, nous avons déjà dit qu'une souillure, par ce même germe, d'une souche bien acclimatée ne présentait pas les mêmes conséquences sur l'avenir de la souche.

b) *Cas du lancement d'une souche sur un milieu favorable à la culture mixte :*

Il faut convenir, cependant, que certains milieux se prêtent mieux que d'autres au *lancement* des souches de flagellés. C'est ainsi qu'il est relativement facile de mettre en route les parasites sur le milieu diphasique de l'Institut Pasteur.

Sur ce milieu, en effet, la flore associée continue à exercer, sur la croissance des flagellés, le même rôle favorable qu'elle joue *in vivo*.

La principale difficulté va être de limiter le développement des germes susceptibles d'inhiber la culture à ses débuts.

L'addition au milieu de faibles quantités de pénicilline suffit, dans la plupart des cas, à obtenir ce résultat. On prendra soin d'ajouter l'antibiotique en quantité strictement suffisante (environ 1 000 unités par ml) afin d'éviter une disparition brutale de la flore et du même coup de la souche.

On aura intérêt, tant que la souche sera hésitante et polluée, à effectuer des repiquages assez fréquents (toutes les 48 heures par exemple), le développement microbien sera alors moins abondant.

Cependant, la cadence des repiquages doit être aussi réglée en fonction de la densité de la population flagellée et de sa vitalité, et on conçoit qu'une certaine expérience de la part de l'opérateur soit nécessaire.

L'ensemencement se fera toujours par simple dépôt à la surface du milieu neuf de 2 à 3 gouttes d'inoculum prélevées à la limite du plan incliné et de l'amidon de riz. Cette quantité sera toutefois augmentée si la richesse du milieu en parasites est faible. Un deuxième contrôle sera fait pour s'assurer que le prélèvement initial a bien été effectué au bon endroit.

Nous ajouterons que le repiquage d'un tube souillé, mais riche en flagellés, est toujours préférable à celui d'un tube contenant peu de bactéries, mais également peu de parasites.

Une conséquence directe de cette remarque est qu'il est parfois nécessaire de repiquer des tubes anciens fortement souillés où les flagellés peuvent prendre un départ tardif.

Il est donc utile de conserver les cultures âgées tant que la souche n'a pas été solidement mise en route sur le milieu considéré. Si la richesse bactérienne augmente dangereusement, on accélère le rythme des repiquages, la proportion des deux populations repiquées se trouve ainsi changée en faveur du protozoaire.

Nous terminerons en notant que les flagellés associés à leur flore n'auront jamais le même caractère de stabilité qu'à l'état pur, ce qui, on le conçoit, est un inconvénient pour les essais *in vitro*.

C'est ainsi qu'il nous est arrivé assez fréquemment d'utiliser les antibiotiques pour limiter une prolifération microbienne anormale sur des cultures mixtes âgées de plusieurs mois.

Les parasites bien adaptés au milieu n'en souffrent pas et le repiquage d'un tube plus ancien permet parfois de retrouver la culture dans son état initial.

c) Cas des cultures pures :

Seul, le milieu de Magara nous a permis l'obtention d'une culture rigoureusement pure et, de ce fait, particulièrement stable. Le *lancement* des souches sur ce milieu est des plus délicats, mais lorsque la souche est réellement adaptée, elle peut être conservée indéfiniment sans aucune difficulté.

Nous venons de voir qu'avec les milieux classiques, l'utilisation judicieuse des antibiotiques freine la multiplication de la flore bactérienne associée et lorsque la densité de cette flore devient trop faible, le protozoaire disparaît progressivement de la culture.

L'utilisation de l'anaérobiose, favorable au développement des flagellés, va compenser progressivement, sur le milieu de Magara, la disparition totale des germes.

Quelle est donc la meilleure méthode pour adapter une souche au milieu de Magara ?

Disons, tout d'abord, qu'au cours de ces travaux, seules les souches de *Trichomonas vaginalis* ont pu être mises en culture avec succès sur ce milieu. Il ne nous a pas été possible, malgré tous

nos efforts, d'y acclimater une souche de *Trichomonas intestinalis* et *Trichomonas parva* n'a pu s'y maintenir d'une façon durable.

Magara préconise d'ensemencer directement son milieu à partir d'un prélèvement génital.

Le principal inconvénient de cette méthode réside dans un envahissement rapide du milieu par des germes anaérobies facultatifs, comme le bacille *Subtilis*, dont il est très difficile de limiter la prolifération.

L'augmentation de la concentration en antibiotique doit être alors faite avec beaucoup de prudence, afin d'éviter un déclin rapide de la souche.

Pour ces diverses raisons, il nous paraît préférable d'opérer en deux étapes.

Dans un premier temps, on implante le *Trichomonas* sur le milieu diphasique où on limite le développement de la flore associée par l'emploi judicieux de pénicilline. Après quelques repiquages, et lorsque la souche semble suffisamment florissante, on fait passer les flagellés et leurs germes sur le milieu de Magara.

Cette seconde étape va permettre de mettre en route progressivement les parasites sur le nouveau milieu et, dans ces conditions, 5 à 10 repiquages peuvent suffire pour obtenir une culture amicrobienne dont on vérifie la stérilité par la subculture sur les milieux usuels.

Pour atténuer encore les inconvénients du changement de milieu, nous conseillons d'utiliser, pendant les premiers repiquages sur le milieu de Magara, des tubes contenant une faible quantité d'amidon de riz dont on connaît le rôle utile sur la croissance des flagellés.

Au fur et à mesure de l'adaptation des protozoaires, on diminue la quantité d'amidon de riz, puis on le supprime totalement.

Ayant ainsi mis en route la souche sur le nouveau milieu, on peut utiliser, pour son entretien, des tubes contenant une faible quantité de pénicilline (2 à 300 unités par ml) qui ne nuit aucunement à la multiplication des parasites, mais les essais seront effectués sur des milieux ne contenant pas d'antibiotiques.

A ce propos, il est intéressant de noter que la culture pure sur milieu de Magara ne nécessite pas l'utilisation prolongée d'antibiotiques, ce qui permet de se rendre compte de l'activité trichomonacide réelle des différentes substances à essayer.

Avec les autres milieux, en revanche, il est souvent nécessaire de freiner la multiplication de la flore par l'addition continue de faibles doses d'antibiotique, ce qui risque de fausser la valeur des essais chimiothérapiques.

Nous avons appliqué la méthode précédente au *lancement* de diverses souches sur le milieu C.P.L.M. et sur le milieu au thio-glycollate.

L'adaptation des flagellés aux milieux monophasiques est toujours facilitée par un isolement préalable de la souche sur le milieu diphase de l'Institut Pasteur.

Nous rappelons cependant que, seul le milieu de Magara nous a permis d'obtenir une souche absolument pure et stable, les autres milieux monophasiques, n'utilisant pas des tubes de Hall, ne nous ayant pas donné de résultats aussi satisfaisants.

IV. — MORPHOLOGIE DES FLAGELLÉS SUR LES DIFFÉRENTS MILIEUX UTILISÉS.

Trichomonas vaginalis prend la forme classique piriforme sur le milieu de l'Institut Pasteur, sur le milieu C.P.L.M. et sur le milieu au thioglycollate.

La mobilité est élevée sur le milieu de l'Institut Pasteur, parfois moins grande sur les deux autres milieux. Nous avons remarqué que l'absence totale de germes provoque une diminution notable de la mobilité et fait apparaître des formes rondes sur les deux derniers milieux, dans ce cas les cultures s'affaiblissent rapidement.

Sur le milieu de Magara, la morphologie des flagellés est différente ; on ne rencontre pas d'éléments piriformes, mais des formes rondes que nous ne pouvons pas toutefois considérer comme des formes de souffrance, car elles possèdent une grande vitalité.

Leur mobilité est un peu particulière, leur mouvement, très rapide, se faisant principalement sur place, le parasite ne progressant pas ici suivant un axe antéro-postérieur.

Sur ce milieu, comme sur les autres, on observe une diminution rapide de la mobilité et l'apparition de formes de souffrance dès que le délai fixé pour le repiquage, (3 à 6 jours), est largement dépassé.

CHAPITRE III

SUBSTANCES TRICHOMONACIDES UTILISÉES DANS NOS TRAVAUX

De très nombreux médicaments ont été proposés pour traiter les affections à *Trichomonas*. Le but de ce travail n'étant pas d'étudier les propriétés trichomonacides d'un grand nombre de produits, mais de rechercher les conditions les plus favorables pour sélectionner les médicaments chimiothérapiques, nous nous sommes limité à l'utilisation de quelques substances que nous pouvons considérer comme des trichomonacides de référence.

Dans cet esprit, nous n'avons pas choisi uniquement des produits d'utilisation récente considérés comme possédant de fortes propriétés trichomonacides, mais nous avons sélectionné différentes substances d'activité trichomonacide variée et appartenant à des groupes chimiques divers.

C'est ainsi que nous avons utilisé :

- 1°) Un dérivé mercuriel : *le mercurothiolate d'éthanolamine ou Merseptyl* *
- 2°) Un sel d'ammonium quaternaire : *le bromure de cethexonium ou Biocidan* *
- 3°) Un dérivé de la quinoléine : *le sulfate d'orthoxyquinoléine ou Sunoxol* *
- 4°) Un dérivé de l'aminonitrothiazole : *l'acétylamino-2 nitro-5 thiazole*.
- 5°) Un antibiotique : *la trichomycine*.
- 6°) Un dérivé quinonique : *la 4,7-phénanthroline 5,6-quinone ou Entobex* *
- 7°) Un dérivé synthétique appartenant à la série des nitro-imidazoles : *le métronidazole ou Flagyl* *

La plupart de ces corps sont très solubles dans l'eau. Ils permettent ainsi la préparation de solutions-mères assez concen-

trées, ce qui présente un avantage certain lorsqu'on a à faire l'essai de produits de faible activité.

Avant de poursuivre l'exposé de nos recherches, il nous a paru opportun de rappeler brièvement les principaux caractères des différentes substances utilisées au cours de ce travail.

LE MERCUROTHIOLATE D'ÉTHANOLAMINE OU MERSEPTYL *

C'est le sel d'éthanolamine de l'acide mercurothiolique.

Propriétés chimiques :

L'acide mercurothiolique, obtenu synthétiquement, est une poudre cristallisée, non hygroscopique, inodore. Il contient 52,35 % de mercure, il est insoluble dans l'eau et soluble dans l'alcool.

Les sels de sodium et d'éthanolamine de l'acide mercurothiolique sont très solubles dans l'eau.

Pouvoir antiseptique :

Cette substance s'est montrée *in vitro* 40 à 150 fois plus active que le phénol à l'égard des bactéries non sporulées et des champignons.

In vivo, sur la peau et en profondeur, la solution à 1 pour 1 000 d'un sel de l'acide mercurothiolique a une activité supérieure à celle de la teinture d'iode officinale.

Pouvoir bactériostatique et antimycosique :

Le mercurothiolate d'éthanolamine s'oppose à la croissance des germes à de faibles dilutions (1/500 000 à 1/1 000 000) et détruit les spores en cinq minutes à partir de la dilution à 1 pour 10 000.

Toxicité :

Sa toxicité est très faible, le lapin supporte jusqu'à 25 mg par kg de poids en injections intraveineuses.

Indications :

Le mercurothiolate d'éthanolamine n'est pas irritant et ne colore pas les tissus.

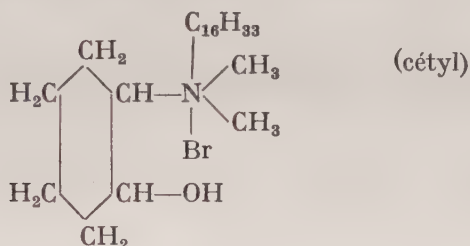
Antiseptique rapide et efficace, il est utilisé en médecine générale pour la désinfection de la peau, des plaies et des muqueuses ; en petite chirurgie pour la désinfection des instruments ; en dermatologie, pour le traitement des mycoses ; en ophtalmologie ; et enfin, en gynécologie, pour le traitement des leucorrhées

et des vaginites mycosiques et à *Trichomonas* (sous forme d'ovules à 1 pour 1 000).

Nous avons utilisé une solution-mère à 1 gramme pour 1 000 à partir de laquelle nous avons effectué les dilutions nécessaires.

BROMURE DE CETHEXONIUM OU BIOCIDAN *

Le Biocidan est un sel d'ammonium quaternaire, c'est le :
bromure de N-cétyl diméthyl-1-cyclohexanol-2 ammonium



Le bromure de cethexonium comporte donc :

- a) une fonction ammonium quaternaire où l'azote est pentavalent ;
- b) un radical qui accentue l'action antiseptique ;
- c) un groupement cyclohexanol dont la fonction alcool gras accentue la pénétration.

C'est une poudre blanche, soluble dans l'eau et l'alcool, incolore, et possédant des propriétés mouillantes.

Propriétés bactériostatiques et bactéricides :

Ces propriétés résultent de sa constitution physico-chimique ; elles ont été confirmées par les expérimentations pharmacodynamiques.

Le Biocidan * est bactériostatique à des dilutions qui varient suivant les germes entre 1 pour 50 000 (*Salmonella typhi*) et 1 pour 1 000 000 (*Staphylococcus aureus*), et bactéricide entre 1 pour 1 000 (*Salmonella typhi*) et 1 pour 500 000 (*Staphylococcus aureus*).

Toxicité :

Le bromure de cethexonium est peu toxique, il n'est pas irritant. Lorsqu'il est appliqué par la voie interne, la désinfection est réalisée en deux minutes.

Indications :

Il peut être utilisé pour la désinfection de la peau, des plaies et du champ opératoire à la concentration de 2 pour 1 000.

A la concentration de 1 pour 1 000, on l'emploie dans la désinfection des brûlures traitées précocement.

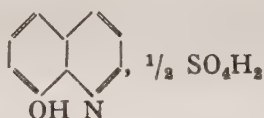
Il a de nombreuses indications en ophtalmologie et en oto-rhino-laryngologie.

Il est peu utilisé en gynécologie et il n'existe pas de formes ovules commercialisées.

Nous avons employé le Biocidan * chirurgical qui est une solution hydro-alcoolique de Biocidan * concentrée à 1 g pour 20 ml en flacons stériles de 20 ml.

SULFATE NEUTRE D'ORTHOXYQUINOLÉINE OU SUNOXOL *

Dérivé de la quinoléine, le sulfate d'orthoxyquinoléine (oxyquinol) répond à la formule :



On remarque dans cette formule : un noyau benzénique et un noyau pyridique ayant en commun deux atomes de carbone.

L'oxyquinol est une poudre jaune clair, à saveur amère, très soluble dans l'eau, peu soluble dans l'alcool.

Propriétés bactériostatiques et bactéricides :

Elles sont voisines de celles du bromure de cethexonium et du mercurothiolate d'éthanolamine.

C'est un antiseptique externe, de grande efficacité, employé le plus souvent sous forme de solution aqueuse à 1 pour 1 000.

Toxicité :

Faible, rarement utilisé par voie interne (0,20 g à 1 g par jour).

Indications :

En dermatologie : dans les affections cutanées d'origine microbienne ou mycosique et pour le traitement des plaies.

En oto-rhino-laryngologie : dans le traitement des angines, pharyngites et laryngites (bains de bouche).

En ophtalmologie : dans les conjonctivites, blépharites, kératites (solution à 1 pour 1 000).

Enfin, en gynécologie, le sulfate d'orthoxyquinoléine s'est montré très actif dans le traitement des diverses leucorrhées. On l'emploie alors, soit sous forme d'ovules, soit sous forme de solution à 1 pour 1 000 pour injections vaginales.

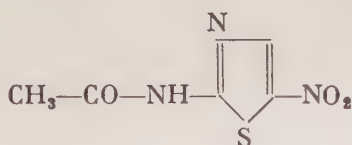
Nous avons utilisé le sulfate d'orthoxyquinoléine sous forme de poudre qui nous a servi à préparer une solution-mère à 10 pour 100.

ACÉTYLAMINO-2 NITRO-5 THIAZOLE (AMINITROZOLE).

C'est en médecine vétérinaire qu'ont été mises en évidence, pour la première fois, les propriétés parasitocides de certains dérivés thiazoliques. C'est ainsi que l'acétylamino-2 nitro-5 thiazole a été utilisé avec succès dans la trichomonase des Pigeons.

Récemment, BUSHBY et COPP (5), ainsi que CUCKLER, KUPFERBERG et MILLMAN (17) ont montré que l'amidification de la fonction aminée de l'aminonitrothiazole exalte considérablement ses propriétés trichomonacides.

Le plus actif des dérivés essayés par ces auteurs est l'acétylamino-2 nitro-5 thiazole qui répond à la formule :



Ce corps se présente sous la forme d'une poudre brune assez peu soluble dans l'eau.

Propriétés trichomonacides expérimentales :

L'acétylamino-2 nitro-5 thiazole, administré par voie orale, protège la Souris contre l'inoculation intra-péritonéale d'une dose mortelle d'une culture de *Trichomonas foetus*.

CAVIER, SAVEL et RUCART (11), (12) ont confirmé ces propriétés. Récemment enfin, CAVIER, SAVEL et Mlle QUEMERAIS (10) ont

montré que cette substance pouvait guérir la Rate infestée expérimentalement par la voie vaginale avec *Trichomonas vaginalis*, lorsqu'on l'administre par la seule voie orale aux doses de 300 à 400 mg par kg de poids pendant six jours consécutifs.

Toxicité :

CAVIER et coll., et CUCKLER et coll. ont établi que ce médicament est peu toxique. C'est ainsi que le Chien supporte sans troubles l'administration orale d'une dose, quotidienne équivalant à 10 mg par kg pendant 135 jours.

La Souris tolère, sans désordre apparent, une dose orale quotidienne de 140 mg par kg pendant six mois.

Par ailleurs, des traitements locaux d'animaux parasités n'ont jamais fait apparaître d'irritations décelables macroscopiquement.

Indications, posologie et mode d'administration :

Actif dans les métrites et les vaginites à *Trichomonas*, l'acétylaminonitrothiazole donne d'excellents résultats aussi bien chez l'homme que chez la femme.

Le médicament est administré par voie buccale à la dose de 300 mg par jour, en trois prises après les repas, pendant dix jours consécutifs.

On peut aussi adjoindre au traitement oral un traitement local sous forme d'ovules à 50 mg et de comprimés vaginaux à 100 mg.

La tolérance de cette substance par voie buccale est bonne, les comprimés enrobés ne se dissolvent que dans l'intestin et les réactions secondaires (nausées, anorexie) sont rares.

Nous avons utilisé, au cours de ce travail, des solutions-mères d'acétylaminonitrothiazole à une concentration égale à 0,33 g pour 1 000. Elles nous ont servi à préparer de nombreuses dilutions.

TRICHOMYCINE :

La trichomycine est un antibiotique obtenu à partir de cultures d'un actinomycète : le *Streptomyces hachijoensis*, isolé à partir d'un échantillon du sol de l'île de Hachijo par Hosoya et coll. Cet antibiotique possède une action très puissante vis-à-vis des protozoaires et des champignons.

C'est une poudre jaune, non cristalline, soluble dans l'alcool faible, légèrement soluble dans l'eau alcaline, mais presque insoluble dans l'eau acide.

Bien que la poudre de trichomycine à l'état sec soit stable pendant des mois, elle perd progressivement son activité en solution aqueuse. Cette perte d'activité est diminuée si on la tamponne avec du citrate à un pH d'environ 7.

La faible solubilité de la trichomycine et la perte rapide de son activité en solution aqueuse nous ont obligé à faire de fréquentes solutions légèrement alcalines de ce corps à une concentration voisine de la saturation.

L'activité trichomonacide de la poudre de trichomycine est fonction de sa teneur en unités trichomonas (*). C'est ainsi que la trichomycine à 2 400 unités par milligramme est beaucoup plus active que l'ancienne préparation qui ne contenait que 1 000 unités par milligramme.

Action trichomonacide expérimentale :

Elle a été mise en évidence par des essais *in vitro* et *in vivo*.

In vitro :

a) *Méthode par contact direct :*

Après avoir mélangé une goutte de culture de 3 à 4 jours de *Trichomonas vaginalis* à 37°C sur une lame avec une goutte de diverses solutions de trichomycine, on note le temps nécessaire à la perte complète de la mobilité du flagellé.

— Temps nécessaire pour l'arrêt des mouvements par contact direct (selon MAGARA) :

Trichomycine à 1 000 unités par ml	{	50 mg par ml : presque instantané
		5 mg par ml : 17 minutes
		1 mg par ml : 27 minutes.

b) *Méthode des dilutions en série sur tubes de cultures :*

Sur une culture de quatre jours dans laquelle la croissance est au maximum, on ajoute différentes dilutions de trichomycine. 1 ml de chaque dilution est mélangé à 9 ml de culture.

L'unité Trichomonas est la plus petite quantité nécessaire pour inhiber la croissance de *Trichomonas vaginalis* dans un millilitre de culture.

— Action trichomonacide de la trichomycine sur les cultures (selon MAGARA) :

Trichomycine à 1 000 unités par mg :	efficace à la dose de 10 à 50 microgrammes par ml.
Trichomycine à 2 00 unités par mg :	efficace à la dose de 2 à 5 microgrammes par ml.

(*) L'unité Trichomonas est la plus petite quantité nécessaire pour inhiber la croissance de *Trichomonas vaginalis* dans un millilitre de culture.

In vivo :

CAVIER, SAVEL et Mlle QUEMERAIS (10) ont montré que la trichomycine était plus active dans la Trichomonase expérimentale de la Rate (technique de Cavier et Mossion) lorsqu'on l'administre, pendant six jours consécutifs à des Rates infestées d'un poids moyen de 150 g, simultanément par la voie orale (10 000 U.T. par jour et par animal) et par la voie vaginale (30 000 U.T. par jour et par animal).

Toxicité :

Elle a été déterminée par les auteurs japonais, chez la Souris, par différentes voies d'introduction. La dose léthale (D.L. 50) est de 34 000, 4 200 et 4 300 U.T. par kg de poids respectivement par les voies sous-cutanée, intra-péritonéale et intraveineuse.

La trichomycine est peu toxique, non irritante, inactive sur les bactéries et respecte par conséquent le bacille de Doederlein.

Indications, posologie et mode d'administration :

La présence fréquente du flagellé dans les voies urinaires de la femme rend indispensable l'administration de l'antibiotique par la voie orale.

Dans la Trichomonase uro-génitale, MAGARA et coll. (55) proposent le traitement mixte suivant :

- a) Administration pendant quinze jours de deux tablettes vaginales (une le matin, une le soir) contenant 50 000 U.T. de trichomycine et 50 000 unités de pénicilline, cette dernière agissant sur la flore microbienne associée.
- b) Traitement oral comportant l'ingestion quotidienne de 100 000 unités de trichomycine (10 comprimés à 10 000 U.T.) répétée pendant dix jours consécutifs.

Le traitement oral permet d'éviter les rechutes en éliminant les flagellés du tractus urinaire.

Les phénomènes d'intolérance rencontrés lors de traitements intensifs sont très rares.

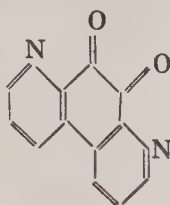
Enfin, il est nécessaire de soumettre simultanément le conjoint à un traitement oral identique pour éliminer toute possibilité de réinfestation.

On obtient ainsi de bons résultats et les récives sont exceptionnelles.

Dans nos essais, nous avons utilisé des solutions de trichomycine à 0,20 g par litre. Ces solutions contiennent par conséquent 200 microgrammes de produit par ml. La trichomycine employée titrait en moyenne 1 000 unités trichomonas par milligramme.

LA 4,7-PHÉNANTHROLINE 5,6-QUINONE OU ENTOBEX *

Sa formule est la suivante :



Ce médicament est doué d'une double action amoebicide et antimicrobienne, il respecte la flore intestinale utile et on l'utilise avec succès dans le traitement des formes aiguës ou chroniques de l'amibiase intestinale.

Pour certains auteurs (SACOGNE, 64), la 4,7-phénanthroline 5,6-quinone serait active vis-à-vis d'autres protozoaires tels que les *Trichomonas*. Pour vérifier ce point de vue, nous avons essayé ce produit dans différentes conditions et avons pu tirer quelques conclusions sur son activité trichomonacide *in vitro*.

L'activité trichomonacide *in vivo* a été étudiée par CAVIER (6).

Ce produit a été administré à des Rats expérimentalement infestés, soit par la voie orale, soit par la voie vaginale.

Administrée par la voie orale seule, la 4,7-phénanthroline 5,6-quinone s'est montrée, dans les conditions de l'expérience, dépourvue d'activité trichomonacide.

Il est probable que sa faible solubilité dans l'eau et sa faible résorption intestinale n'ont pas permis d'atteindre dans l'organisme une concentration efficace.

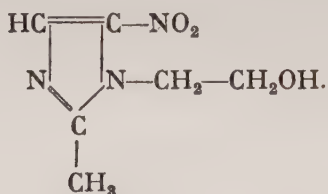
Administré par la voie vaginale, ce produit présente une certaine activité trichomonacide, mais d'intensité très modérée.

Nous avons utilisé pour nos essais des solutions-mères de 4,7-phénanthroline 5,6-quinone de concentration égale à 0,33 g par litre. Cette concentration a été obtenue sans difficulté, bien que ce corps soit relativement peu soluble.

LE MÉTRONIDAZOLE OU FLAGYL *

Le métronidazole est un dérivé synthétique appartenant à la série des nitro-2-imidazoles, substances qui correspondent à la partie active d'un antibiotique isolé d'un *Streptomyces* par COSAR et JULOU (16).

Le métronidazole est l'(hydroxy-2'éthyl) -1 méthyl-2 nitro-5 imidazole.



Il se présente sous l'aspect d'une poudre cristalline blanche à reflets jaunes, soluble dans l'eau et dans l'alcool.

Action trichomonacide expérimentale :

L'activité expérimentale a été étudiée *in vitro* et *in vivo*.

In vitro :

L'expérimentation étant conduite suivant la technique de BUSHBY et COPP (5), il suffit d'une dilution renfermant 1 pour 400 000 de métronidazole pour obtenir en 24 heures un effet trichomonacide atteignant 99 % des parasites.

In vivo :

La technique utilisée a été celle de LYNCH, HOLLEY et MARGISON (52), qui consiste à injecter sous la peau du dos d'une Souris 0,50 ml d'une culture de *Trichomonas* datant de 48 heures. Après 7 jours, les animaux sont sacrifiés et la zone d'inoculation examinée microscopiquement et macroscopiquement.

Les sujets témoins présentent des lésions où pullulent les parasites.

Par contre, les animaux ayant reçu par voie buccale une dose quotidienne de 10,5 mg de métronidazole par kg de poids le jour de l'inoculation et les quatre jours suivants ne présentent pas de lésions au point d'inoculation et on ne décèle la présence d'aucun flagellé sur le frottis.

Enfin, il faut noter que le métronidazole est dépourvu d'effets nocifs à l'égard du bacille de Doederlein, hôte normal et nécessaire d'un vagin sain.

Administré par voie buccale, il passe assez vite dans la circulation, s'élimine rapidement par la voie urinaire et confère au sérum et à l'urine des propriétés trichomonacides très nettes.

Toxicité :

La toxicité aiguë du métronidazole a été étudiée chez la Souris et apparaît comme très faible. En effet, la dose léthale 50 par voie buccale est de 4,35 par kg.

Indications, posologie et mode d'administration :

Ce produit est remarquablement actif dans les urétrites et les vaginites à *Trichomonas*. Le nombre d'observations favorables et le recul du temps sont désormais suffisants pour qu'on puisse le considérer comme présentant une activité trichomonacide supérieure à celle de la plupart des médicaments utilisés jusqu'alors.

Chez l'homme, le traitement s'effectue par voie buccale (posologie quotidienne : 500 mg administrés en deux prises de 250 mg chacune pendant dix jours consécutifs).

Chez la femme, on a recours au traitement mixte comportant :

- un traitement oral aux mêmes doses que chez l'homme,
- un traitement local comportant la mise en place quotidienne le soir pendant 10 à 20 jours d'un comprimé vaginal à 0,50 g.

Le métronidazole est très bien supporté aux doses thérapeutiques et il n'apparaît que très rarement des troubles digestifs mineurs tels que gastralgie et nausées.

Comme il s'agit d'un dérivé nitré, il est toutefois recommandé de contrôler la formule sanguine, notamment en cas de traitement prolongé ou de reprise de traitement.

Nous avons utilisé des solutions-mères de métronidazole à 0,20 g pour 1 000 à partir desquelles nous avons effectué différentes solutions.

*
**

Toutes les substances décrites ont été essayées vis-à-vis de plusieurs souches de *Trichomonas* en cultures sur des milieux différents. Nous avons effectué seulement quelques expériences avec la 4,7-phénantroline 5,6-quinone et le métronidazole, ces médicaments n'étant pas commercialisés au début de nos recherches.

Comme nous le verrons, nous avons sélectionné parmi ces diverses substances celles qui, possédant une bonne solubilité aqueuse, présentent une forte activité trichomonacide *in vitro* et donnent les résultats les plus constants.

Nous avons été ainsi amené à proposer une substance trichomonacide étalon.

CHAPITRE IV

ESSAIS D'ACTIVITÉ TRICHOMONACIDE PRATIQUÉS EN TUBES DE CULTURE

Ce chapitre comprend deux parties :

- 1°) Description détaillée de la technique utilisée pour évaluer le pouvoir trichomonacide de différentes substances antiseptiques ou antibiotiques.
- 2°) Présentation de nos essais qui seront groupés suivant la nature des milieux employés.
 - a) Discussion et interprétation des résultats obtenus dans chaque cas,
 - b) Interprétation générale où nous tiendrons compte de l'ensemble des résultats acquis au cours de ces essais et conclusion où nous proposerons pour les essais en tubes un milieu préférentiel et une substance trichomonacide étalon.

A. — TECHNIQUE UTILISÉE POUR LES ESSAIS EN TUBES.

- 1°) **Généralités :** Considérations générales sur le choix d'une technique d'essai.

Dans le premier chapitre de la seconde partie de ce travail, nous avons donné une description détaillée des milieux de culture utilisés et de leur préparation. Nous n'aurons donc pas à y revenir.

Il en est de même de l'important problème de l'adaptation des souches de flagellés à un milieu et de leur entretien, avec ou sans germes, qui a été étudié dans un second chapitre.

On a pu remarquer, à ce sujet, que l'étude des milieux de culture est intimement liée à celle des souches de *Trichomonas*.

Ajoutons aussi que l'obtention d'une souche amicrobienne de flagellés est fonction non seulement d'une technique appropriée, mais aussi de l'emploi d'un milieu permettant d'y parvenir.

Enfin, dans un troisième chapitre, nous avons passé en revue les différentes substances trichomonacides utilisées en les considérant, dans le cadre de ces expériences, comme des éléments de travail nécessaires à la mise au point de nos essais.

Il importe maintenant de décrire la technique d'essai en tubes que nous avons couramment utilisée au cours de ces travaux.

*
**

Les auteurs ont proposé de nombreuses méthodes pour apprécier l'activité des substances trichomonacides. Nous en avons décrit un certain nombre dans la première partie de ce travail. Elles comportent toutes, comme nous l'avons vu, des avantages et des inconvénients.

On est frappé de constater que, pour une même espèce et pour une même substance, les résultats obtenus sont souvent fort différents.

Certains auteurs attribuent à une substance antibiotique une activité trichomonacide remarquable, d'autres la trouvent peu active ou même totalement inactive.

LAMY (43) a tenté d'expliquer ces divergences, et a tiré quelques données pratiques que nous pouvons résumer ainsi :

a) L'activité d'une substance sur *Trichomonas vaginalis* peut dépendre de la composition et de la sensibilité de la flore, ce qui explique pourquoi telle substance n'a pas donné des résultats identiques dans tous les cas et à tous les auteurs.

Il s'ensuit que l'activité d'un produit vis-à-vis de la flore bactérienne globale devrait être également précisée.

b) L'addition de faibles quantités d'antibiotiques pour freiner la multiplication de la flore associée peut gêner indirectement le développement des flagellés en les privant des germes qui leur sont nécessaires. Les essais *in vitro* ne peuvent donc pas être pratiqués dans ces conditions.

Ces faits expliquent pourquoi il est plus facile d'agir sur des cultures de flagellés, auxquelles on ajoute la substance active dès le départ de la culture, alors que la flore est pauvre, plutôt que sur des cultures de 48 heures où les bactéries se sont abondamment multipliées.

Il est évident que ces observations, relatives à la présence de la flore associée, deviennent sans objet si l'on opère sur des cultures bactériologiquement pures.

Enfin, nous estimons personnellement qu'une grande part des divergences constatées peut être expliquée par les différences qui existent entre les techniques proposées.

Compte tenu de ces remarques, et dans un but de standardisation, il nous a paru nécessaire d'utiliser la même technique d'essai, quel que soit le milieu employé.

Il sera ainsi possible de comparer les résultats obtenus sur les différents milieux et d'en tirer des conclusions.

2°) Principe de la technique d'essai.

Nous avons porté notre choix sur une méthode fondée sur l'inhibition au départ des cultures.

Son principe consiste à introduire dans un milieu donné des quantités variables du produit à étudier. On ensemence ensuite un nombre connu de flagellés et, après trois jours d'incubation à 37°C, on note quelle dilution limite permet la culture.

Nous avons préféré cette méthode à la technique courante décrite par BUSHBY et COPP (5) qui est fondée sur la détermination de l'action léthale de la substance sur une culture de flagellés de 48 heures. Dans cette dernière technique, la lecture des résultats est effectuée à intervalles déterminés, soit 2 heures, 4 heures, 6 heures et 24 heures après l'introduction de la substance inhibitrice, les tubes de cultures étant toujours maintenus à 37°C.

Le nombre des résultats obtenus rend, dans ce dernier cas, plus difficile l'interprétation de l'activité trichomonacide ; aussi avons-nous retenu la première méthode dont la simplicité s'accorde avec le but que nous recherchons.

3°) Description détaillée de la technique d'essai.

La mise en œuvre de cette technique comprend trois étapes principales :

- a) *Première étape* : on effectue des dilutions de la solution-mère de la substance à essayer et on les introduit dans les tubes de cultures.
- b) *Deuxième étape* : on ensemence chaque tube avec un nombre déterminé de Trichomonas.
- c) *Troisième étape* : après une période d'incubation de trois jours, on procède à la lecture des résultats et on vérifie, par la subculture, les tubes où il n'a pas été trouvé de flagellés à l'examen microscopique.

PREMIÈRE ÉTAPE

DILUTION DE LA SUBSTANCE A ESSAYER ET INTRODUCTION DE LA QUANTITÉ DONNÉE DANS LES TUBES DE CULTURE

1°) Matériel utilisé :

- séries de tubes Pyrex bouchés au coton et stérilisés au four Pasteur,
- pipettes de 1 ml, 2 ml, 10 ml et 20 ml obturées au coton et stérilisées au four Pasteur dans des cylindres métalliques,
- erlenmeyers de 250 ml bouchés au coton et stérilisés comme précédemment (destinés à recevoir de l'eau bi-distillée stérile),
- séries de portoirs.

2°) Répartition du milieu pour les essais :

S'il s'agit du milieu N de l'Institut Pasteur, les tubes devront toujours contenir, après addition de la solution d'antiseptique, un volume liquide de 5 ml.

On répartira donc stérilement la phase liquide en utilisant, soit des pipettes de 10 ml, soit des rhéomètres stériles.

On préparera ainsi plusieurs séries de tubes, les uns contenant 4 ml de phase liquide, d'autres 4,5 ml, d'autres encore 5 ml.

S'il s'agit du milieu de MAGARA, du milieu C.P.L.M. de JOHNSON et TRUSSEL ou du milieu au thioglycollate, le volume final par tube devant être de 10 ml, on répartira de la même manière les milieux correspondants à raison de 9 ml dans une série de tubes, 9,5 ml et 10 ml dans deux autres séries.

3°) Solutions-mères d'antiseptiques utilisées :

- Mercurothiolate d'éthanolamine : solution à 1 g p. 1 000 (1 000 microgrammes par ml).
- Sulfate d'orthoxyquinoléine : solution à 0,10 g p. 1 000 (100 microgrammes par ml).
- Bromure de cethexonium : solution à 0,50 pour 10 ml (50 000 microgrammes par ml).
- Métronidazole : solution à 0,20 p. 1 000 (200 microgrammes par ml).
- Acétylaminonitrothiazole : solution à 0,33 g p. 1 000 (330 microgrammes par ml).

- Trichomycine : solution à 0,20 g p. 1 000 (200 microgrammes par ml).
- 4,7-phénanthroline 5,6-quinone : solution à 0,33 g p. 1 000 (330 microgrammes par ml).

Nous avons choisi les concentrations ci-dessus, soit parce que le produit était présenté dans le commerce à cette dilution (mercurothiolate d'éthanolamine, bromure de cethexonium), soit pour des raisons de solubilité (corps peu solubles : trichomycine, acétylaminonitrothiazole), ou encore, pour la commodité des manipulations.

4° Dilution des solutions-mères d'antiseptiques :

Trois à quatre dilutions de la solution-mère ont été nécessaires pour les corps qui se sont révélés posséder de fortes propriétés trichomonacides ; pour les produits peu actifs, il nous a rarement fallu effectuer plus d'une dilution de la solution-mère.

Nous citerons, à titre d'exemple, la méthode utilisée pour diluer les solutions-mères de mercurothiolate d'éthanolamine et de sulfate d'orthoxyquinoléine.

Dilutions de la solution-mère de mercurothiolate d'éthanolamine

Première dilution : on prélève, à l'aide d'une pipette stérile, 1 ml de la solution-mère (à 1 000 microgrammes par ml) qui est introduit dans un tube contenant 9 ml d'eau bi-distillée stérile.

1 ml de la dilution au 1/10^e ainsi réalisée contient donc 100 microgrammes de mercurothiolate d'éthanolamine.

Deuxième dilution : 1 ml de la première dilution, ajouté à 9 ml d'eau bi-distillée stérile, donne une dilution au 1/100^e (dont 1 ml renferme 10 microgrammes de substance).

Troisième dilution : 1 ml de la deuxième dilution est ajouté à 9 ml d'eau bi-distillée stérile, ce qui donne une troisième dilution dont 1 ml contient un microgramme de mercurothiolate d'éthanolamine.

Nous avons rarement eu à utiliser des dilutions plus grandes de ce corps.

Dilution de la solution-mère de sulfate d'orthoxyquinoléine

La solution-mère est obtenue en pesant 0,10 g de la substance qu'on dissout dans 10 ml d'eau bi-distillée stérile (solution à 10 000 microgrammes par ml).

Première dilution : 1 ml de la solution-mère est dilué dans 9 ml d'eau bi-distillée stérile. 1 ml de cette première dilution contient donc 1 000 microgrammes de sulfate d'orthoxyquinoléine.

Deuxième dilution : 1 ml de la première dilution plus 9 ml d'eau bi-distillée stérile donnent une deuxième dilution, dont 1 ml contient 100 microgrammes d'antiseptique.

Troisième dilution : une troisième dilution est obtenue en diluant 1 ml de la deuxième dilution dans 9 ml d'eau bi-distillée stérile. 1 ml de cette dernière dilution contient 10 microgrammes de substance.

Quatrième dilution : il a parfois été nécessaire d'utiliser une quatrième dilution qui a été préparée par dilution au $1/10^{\circ}$ de la troisième dilution. 1 ml de cette quatrième dilution contient donc 1 microgramme de sulfate d'orthoxyquinoléine.

Toutes les substances antiseptiques à essayer peuvent être diluées suivant des principes analogues.

Si la solution-mère est fortement concentrée, on peut directement effectuer une première dilution au $1/100^{\circ}$.

5°) Répartition des différentes concentrations de la substance dans les tubes de culture :

La pratique de nos essais en tubes consistant à mettre en contact les flagellés avec des concentrations variées de la substance à étudier, il est nécessaire de choisir tout d'abord les différentes concentrations par ml que doivent contenir les tubes de cultures.

Nous verrons plus loin que deux séries d'essais, effectuées successivement, sont indispensables pour permettre de connaître la dose létale minimale dans les conditions de l'expérience.

Comme il a été dit, nous avons à notre disposition :

- a) des solutions-mères d'antiseptiques et leurs dilutions d'une part ;
- b) les tubes de cultures qui contiennent un volume de phase liquide déterminé d'autre part.
(4 ml, 4,5 ml, 5 ml pour le milieu N de l'Institut Pasteur ;
9 ml, 9,5 ml, 10 ml pour les autres milieux qui ne comportent que la phase liquide).

La concentration par ml de chacun des tubes étant fixée au préalable (et par suite, celle que doit contenir la phase liquide), on déterminera alors quelle dilution doit être utilisée pour chacun des tubes.

La quantité de substance contenue dans les 5 ou 10 ml de milieu devra par conséquent se trouver contenue dans un volume de la dilution judicieusement choisi pouvant varier de 0,1 à 1 ml.

On répartira ensuite à l'aide de pipettes stériles de 1 ou 2 ml les volumes ainsi calculés dans les tubes de milieux.

Comme il est nécessaire que le volume final de chaque tube soit très voisin de 5 ou 10 ml suivant les cas, nous utiliserons les tubes qui contiennent le volume de milieu complémentaire.

Nous avons préparé, à cet effet, des tubes de milieux dont le volume de la phase liquide est connu et varié.

Ces opérations de dilution ont toujours été présentées, au préalable, sous forme de tableaux schématiques qui permettent d'éviter les erreurs au cours des manipulations.

Le développement de l'exemple précis suivant va mettre en lumière le procédé de dilution utilisé :

Présentation des opérations de dilution réalisées lors des essais préliminaires et définitifs effectués pour déterminer l'activité trichomonacide du mercurothiolate d'éthanolamine et du sulfate d'orthoxyquinoléine vis-à-vis d'une souche ancienne de Trichomonas vaginalis. (Souche S 1)

Milieux utilisés : — Milieu N de l'Institut Pasteur.
— Milieu de Magara.

a) ESSAIS SUR MILIEU N DE L'INSTITUT PASTEUR :

— **Emploi du mercurothiolate d'éthanolamine :**

— *Dilutions utilisées :*

solution-mère (m)	1 ml = 1 000 μg
dilution (1)	1 ml = 100 μg
dilution (2)	1 ml = 10 μg
dilution (3)	1 ml = 1 μg

Concentration par ml choisie	Quantité contenue dans le volume total de la phase liquide	Volume de la dilution correspondante à employer	Volume de la phase liquide à employer	Résultats de l'essai
— <i>Essais préliminaires :</i>				
2 μg par ml	10 μg pour 5 ml	1 ml de (2)	4 ml	pousse
10 μg par ml	50 μg pour 5 ml	0,50 ml de (1)	4,5 ml	ne pousse pas
20 μg par ml	100 μg pour 5 ml	1 ml de (1)	4 ml	ne pousse pas
50 μg par ml	250 μg pour 5 ml	0,25 ml de (m)	4,5 ml	ne pousse pas
100 μg par ml	500 μg pour 5 ml	0,50 ml de (m)	4,5 ml	ne pousse pas
— <i>Essais définitifs :</i>				
2 μg par ml	10 μg pour 5 ml	1 ml de (2)	4 ml	pousse
5 μg par ml	25 μg pour 5 ml	0,25 ml de (1)	4,5 ml	pousse
10 μg par ml	50 μg pour 5 ml	0,50 ml de (1)	4,5 ml	ne pousse pas

— *Remarques :*

- 1) Nous avons préféré exprimer les concentrations en microgrammes par ml plutôt que d'employer, comme le font de nombreux auteurs, des rapports. Les résultats, ainsi présentés, nous ont semblé plus faciles à comparer.
- 2) Par ailleurs, nous remarquerons dans le tableau ci-dessus que pour les concentrations de $5\text{ }\mu\text{g}$ par ml et de $50\text{ }\mu\text{g}$ par ml, la totalité des volumes de liquide contenus dans les tubes, après addition de la dilution correspondante, n'est pas exactement de 5 ml.

D'une manière générale, nous ne tiendrons pas compte de ces différences qui sont négligeables, compte tenu des conditions où s'effectuent les essais, et qui, comme nous l'avons constaté, n'en modifient pas les résultats.

— **Emploi du sulfate d'orthoxyquinoléine :**— *Dilutions utilisées :*

solution-mère (m)	1 ml = 10 000 μg
dilution (1)	1 ml = 1 000 μg
dilution (2)	1 ml = 100 μg
dilution (3)	1 ml = 10 μg

Concentra- tion par ml choisie	Quantité contenue dans le volume total de la phase liquide	Volume de la dilution cor- respondante à employer	Volume de la phase liquide à employer	Résultats de l'essai
— <i>Essais préliminaires :</i>				
2 μg par ml	10 μg pour 5 ml	1 ml de (3)	4 ml	pousse
10 μg par ml	50 μg pour 5 ml	0,50 ml de (2)	4,5 ml	pousse
20 μg par ml	100 μg pour 5 ml	1 ml de (2)	4 ml	pousse
50 μg par ml	250 μg pour 5 ml	0,25 ml de (1)	4,5 ml	pousse
100 μg par ml	500 μg pour 5 ml	0,50 ml de (1)	4,5 ml	ne pousse pas
— <i>Essais définitifs :</i>				
40 μg par ml	200 μg pour 5 ml	0,20 ml de (1)	5 ml	pousse
80 μg par ml	400 μg pour 5 ml	0,40 ml de (1)	4,5 ml	ne pousse pas
100 μg par ml	500 μg pour 5 ml	0,50 ml de (1)	4,5 ml	ne pousse pas

b) ESSAIS SUR MILIEU DE MAGARA :

— Emploi du mercurothiolate d'éthanolamine :

— Dilutions utilisées :

solution-mère (m)	1 ml =	1 000 μg
dilution (1)	1 ml =	100 μg
dilution (2)	1 ml =	10 μg
dilution (3)	1 ml =	1 μg

Concentration par ml choisie	Quantité contenue dans le volume total de la phase liquide	Volume de la dilution correspondante à employer	Volume de la phase liquide à employer	Résultats de l'essai
— Essais préliminaires :				
0,1 μg par ml	1 μg pour 10 ml	1 ml de (3)	9 ml	pousse
1 μg par ml	10 μg pour 10 ml	1 ml de (2)	9 ml	ne pousse pas
10 μg par ml	100 μg pour 10 ml	1 ml de (1)	9 ml	ne pousse pas
20 μg par ml	200 μg pour 10 ml	0,20 ml de (m)	10 ml	ne pousse pas
50 μg par ml	500 μg pour 10 ml	0,50 ml de (m)	9,5 ml	ne pousse pas
— Essais définitifs :				
0,1 μg par ml	1 μg pour 10 ml	1 ml de (3)	9 ml	pousse
0,5 μg par ml	5 μg pour 10 ml	0,50 ml de (2)	9,5 ml	rare parasites mobiles
1 μg par ml	10 μg pour 10 ml	1 ml de (2)	9 ml	ne pousse pas

— Remarque :

Nous avons utilisé, *a priori*, des concentrations plus faibles de substance avec ce milieu, les flagellés en culture pure étant, en général, plus sensibles à l'action des antiseptiques.

— Emploi du sulfate d'orthoxyquinoléine :

— Dilutions utilisées :

dilution (1)	1 ml =	1 000 μg
dilution (2)	1 ml =	100 μg
dilution (3)	1 ml =	10 μg
dilution (4)	1 ml =	1 μg

Concentration par ml choisie	Quantité contenue dans le volume total de la phase liquide	Volume de la dilution correspondante à employer	Volume de la phase liquide à employer	Résultats de l'essai
— Essais préliminaires :				
0,1 μg par ml	1 μg pour 10 ml	1 ml de (4)	9 ml	pousse
1 μg par ml	10 μg pour 10 ml	1 ml de (3)	9 ml	pousse
10 μg par ml	100 μg pour 10 ml	1 ml de (2)	9 ml	ne pousse pas
20 μg par ml	200 μg pour 10 ml	0,20 ml de (1)	10 ml	ne pousse pas
— Essais définitifs :				
1 μg par ml	10 μg pour 10 ml	1 ml de (3)	9 ml	pousse
2 μg par ml	20 μg pour 10 ml	0,20 ml de (2)	10 ml	pousse
5 μg par ml	50 μg pour 10 ml	0,50 ml de (2)	9,5 ml	ne pousse pas
10 μg par ml	100 μg pour 10 ml	1 ml de (2)	9 ml	ne pousse pas

Dans la pratique, il suffira de suivre scrupuleusement les schémas de dilution ainsi présentés, les tubes de milieux contenant les volumes de phase liquide complémentaires étant disposés sur une rangée d'un portoir, les tubes de dilution sur une autre.

Toutes les manipulations sont faites aseptiquement.

DEUXIÈME ÉTAPE

ENSEMENCEMENT DES MILIEUX AVEC UN NOMBRE DÉTERMINÉ DE FLAGELLÉS

1°) Principe :

Dans cette seconde étape, on compte tout d'abord les flagellés qui se sont multipliés après trois jours de culture à l'étuve à 37°C sur un milieu identique à celui devant être utilisé pour les essais.

La suspension de *Trichomonas* est ensuite diluée, si nécessaire, afin que le nombre de flagellés reste compris entre certaines limites.

On procède alors à l'ensemencement d'un volume connu de cette suspension dans chacun des tubes de l'essai.

2°) Technique :

Trois jours avant l'essai, onensemence deux à trois tubes du milieu contenant un volume déterminé de phase liquide (5 ml ou 10 ml suivant qu'il s'agit du milieu de Pasteur ou du milieu de Magara).

S'il s'agit du milieu N de l'Institut Pasteur, on prendra soin d'utiliser des tubes contenant de très faibles quantités d'amidon de riz. En effet, cet élément figuré gêne considérablement la numération des parasites à la cellule de Nageotte.

Numération des flagellés à la cellule de Nageotte :

a) *caractères de la cellule* : la profondeur de la cellule est de 0,5 mm. Sur son fond est gravé un carré de 10 mm de côté divisé en 40 bandes de 1/4 de mm de large.

Au niveau du quadrillage, la contenance de la cellule est de 50 mm³, chaque bande ayant un volume de 1,25 mm³.

b) *pratique de la numération* : pour le cas des essais effectués sur le milieu N de l'Institut Pasteur, on procède tout d'abord à l'aspiration de 3 ml de milieu à l'aide d'une pipette stérile, puis les flagellés qui se sont multipliés dans le fond du tube sont mis en suspension par simple agitation dans les 2 ml de la phase liquide restante.

S'il s'agit des milieux contenant 10 ml de phase liquide, on retirera de même 5 ml de milieu avant de mettre les *Trichomonas* en suspension dans le liquide restant.

Dans tous les cas, on prélève ensuite à la pipette Pasteur 3 à 4 gouttes de la suspension que l'on dépose sur une cellule de Nageotte.

Après avoir recouvert la préparation d'une lamelle mince, on effectue la numération à un objectif de moyen grossissement.

Le nombre et la mobilité des flagellés étant considérables, on se borne à numérer approximativement les parasites contenus dans deux bandes de $1,25 \text{ mm}^3$ chacune. On rapporte ensuite au mm^3 .

En opérant comme il a été dit, le nombre des *Trichomonas* varie entre 500 et 2 000 par mm^3 .

La suspension contient par conséquent de 500 000 à 2 000 000 de cellules par ml.

Entre ces limites, il n'est pas nécessaire de diluer la suspension, et dans la pratique on se borne, après vérification du nombre des flagellés, à ensemercer :

— 4 gouttes de cette suspension sur les tubes de milieu N de l'Institut Pasteur (soit $1/10^6$ de ml, ce qui correspond à un nombre de *Trichomonas* compris entre 50 000 et 200 000).

— $3/10^6$ de ml de la suspension correspondante sur le milieu monophasique de Magara (soit 150 000 à 600 000 individus).

En effet, les essais comparatifs effectués avec des inoculums différents, mais compris dans les limites indiquées, ont donné des résultats identiques.

On observe seulement dans les tubes témoins, et lorsque la concentration en antiseptique le permet, un développement plus rapide de la culture quand le nombre des flagellésensemencés est important.

Il semble donc que les résultats des essais ne soient pas fonction du nombre de *Trichomonas* mobilesensemencés, tout au moins dans certaines limites.

Ajoutons, cependant, comme nous l'avons déjà signalé, qu'il paraît nécessaire d'ensemencer un nombre suffisant de flagellés.

En dessous d'un certain « seuil », les *Trichomonas* ne semblent pas devoir se multiplier dans les conditions habituelles. Ce nombre « indispensable » est variable suivant les cas, mais il est rarement inférieur à quelques milliers d'individus.

TROISIÈME ÉTAPE

INCUBATION A 37° C DE TOUS LES TUBES ENSEMENCÉS

L'ensemencement de tous les tubes de l'essai et des tubes témoins ayant été effectué comme il a été indiqué, les milieux sont placés à l'étuve à 37°C pendant 72 heures.

On recherche alors au microscope dans chacun des tubes la présence de *Trichomonas* mobiles. Les tubes négatifs sont contrôlés par des subcultures sur des milieux neufs.

B. — LES RÉSULTATS

1°) Expression détaillée des résultats d'un essai :

Comme il a été dit, nous effectuons toujours deux séries d'essais :

a) *Essais préliminaires :*

Ils consistent à établir une gamme très large de dilutions qui va permettre de connaître l'ordre de grandeur de la concentration léthale.

b) *Essais définitifs :*

Ils contrôlent les premiers essais et permettent de déterminer avec précision la concentration léthale des substances à étudier.

Nous donnons ci-après, à titre d'exemple, un tableau où l'on trouve détaillés les résultats obtenus dans le cas précis suivant : « Action trichomonacide sur milieu de Magara de quelques substances antiseptiques vis-à-vis d'une souche de *Trichomonas vaginalis* amicrobienne (souche S 1) ».

Dans cet exemple, nous avons mentionné tous les essais effectués et, par suite, tous les résultats obtenus.

Le protocole détaillé de toutes nos expériences ne pouvant être décrit de nouveau, nous nous bornerons par la suite à indiquer, pour chaque substance essayée, la seule dose léthale définitive exprimée en microgrammes par ml.

Dans tous nos essais, nous exprimerons conventionnellement :

- par le signe +, la présence de *Trichomonas* mobiles après trois jours d'étuve à 37°C ;
- par le signe —, l'absence totale de *Trichomonas* mobiles dans les mêmes conditions (dose léthale).

**Résultats des essais effectués sur la souche S 1
après trois mois d'entretien sur le milieu de Magara**

(Concentration du milieu en sérum : 5 %)

Acétyl-aminonitrothiazole	Mercuriothiolate d'éthanolamine	Sulfate d'orthoxyquinoléine	Bromure de cethexonium	Trichomycine	4,7-phé-nanthroline 5,6-quinone
Essais préliminaires					
Témoin +	Témoin +	Témoin +	Témoin +	Témoin +	Témoin +
0,1 µg	1 µg	0,1 µg	0,1 µg	0,1 µg	0,1 µg
par ml +	par ml —	par ml +	par ml +	par ml +	par ml +
1 µg	10 µg	1 µg	1 µg	1 µg	1 µg
par ml +	par ml —	par ml +	par ml +	par ml +	par ml +
10 µg	20 µg	10 µg	10 µg	10 µg	10 µg
par ml —	par ml —	par ml —	par ml —	par ml —	par ml +
20 µg	50 µg	20 µg	20 µg	20 µg	20 µg
par ml —	par ml —	par ml —	par ml —	par ml —	par ml —
Essais définitifs :					
Témoin +	Témoin +	Témoin +	Témoin +	Témoin +	Témoin +
1 µg	0,1 µg	1 µg	1 µg	1 µg	10 µg
par ml +	par ml +	par ml +	par ml +	par ml +	par ml +
2 µg	0,5 µg	2 µg	2 µg	2 µg	20 µg
par ml +	par ml +	par ml +	par ml +	par ml +	par ml —
5 µg	1 µg	5 µg	5 µg	5 µg	
par ml —	par ml —	par ml —	par ml —	par ml —	
10 µg		10 µg	10 µg	10 µg	
par ml —		par ml —	par ml —	par ml —	

2°) Résultats des essais effectués sur milieu N de l'Institut Pasteur :

α) **Essais effectués sur les flagellés associés à leur flore (cultures mixtes) :**

1. — *Cas de l'emploi d'une souche ancienne de Trichomonas vaginalis (Souche S 1) :*

Cette souche était entretenue sur le milieu N de l'Institut Pasteur depuis environ six ans lorsqu'elle nous a été confiée. Nous avons pu l'entretenir pendant trois ans, ce qui nous a permis de contrôler les essais un an, deux ans et deux ans et demi après les premières expériences.

Les tableaux récapitulatifs se rapportant à ces essais ne comportent que les doses minimales léthales.

Comme on le voit dans le Tableau I, nous avons tenté quelques expériences sur un milieu N ne comportant que la seule phase liquide et l'amidon de riz.

Discussion des résultats du Tableau I

Quelques faits sont à retenir de l'examen de ce tableau.

— On peut observer que, dans la plupart des cas, les résultats d'essais effectués à de grands intervalles de temps sont relativement voisins.

— S'il a été avancé que la résistance d'une souche tend à augmenter au cours du vieillissement, il apparaît ici que la résistance de la souche S 1 tend à diminuer au cours de la période que nous avons explorée.

Il faut ajouter, cependant, que cette souche était déjà fort ancienne au moment où les expériences furent commencées ; elle n'a donc pu être suivie depuis son origine.

Il semble donc plausible qu'une telle souche puisse présenter « des hauts et des bas » qui traduisent une diminution de sa stabilité.

Parmi les causes possibles de cet état de choses, on peut mentionner le rôle de la flore associée dont les variations quantitatives ne sont pas négligeables au cours du vieillissement.

— La substance la plus efficace est ici le mercurothiolate d'éthanolamine, la moins active étant la 4,7-phénanthroline 5,6-quinone. Les autres produits utilisés ont, entre eux, des activités assez voisines.

— Si l'on supprime le plan incliné protéique, la souche devient légèrement plus sensible dans les mêmes conditions opératoires et au même moment.

2. — Cas de la souche S 2 (Tableau II) :

Prélevée au niveau des culs-de-sacs postérieurs vaginaux, cette souche de *Trichomonas vaginalis* n'a pu être entretenue, au-delà de huit mois, sur le milieu N de l'Institut Pasteur.

Nous avons cherché à adapter cette souche âgée de sept mois sur le milieu de Magara, mais toutes ces tentatives ont échoué, malgré nos efforts.

Il est possible que la vitalité des flagellés, à ce moment plus faible sur le milieu de Pasteur, n'ait pas permis leur mise en route sur le nouveau milieu.

Nous avons souvent observé, en effet, que le passage d'une souche sur un autre milieu ne réussissait que dans le cas où les flagellés repiqués étaient en nombre assez important et présentaient, au contrôle microscopique, une mobilité suffisante.

Nous avons effectué des essais sur cette souche trois mois, puis six mois après sa mise en route sur le milieu N de l'Institut Pasteur.

Les résultats en sont rassemblés dans le Tableau II.

Discussion des résultats du Tableau II

Les résultats des deux séries d'essais pratiqués sont très voisins ; la résistance de la souche ne semble pas avoir augmenté d'une manière sensible après six mois.

La suppression du plan incliné protéique n'a pas eu d'influence particulière sur le résultat.

Nous remarquerons, ici aussi, la forte activité du mercurothiolate d'éthanolamine ; par contre, le bromure de cethexonium se révèle, comme dans le cas de la souche S 1, environ quatre fois moins actif.

L'essai effectué après passage sur le vagin de la Rate n'a pas donné de résultats concluants. Nous noterons toutefois un léger renforcement de la résistance de la souche.

3. — Cas de la souche S 3 (Tableau III) :

La souche 3, comme la souche S 2, nous a été confiée par la Faculté, dès son prélèvement. Elle est constituée de *Trichomonas vaginalis* à caractères morphologiques typiques ; malheureusement, il n'a pas été possible de l'entretenir pendant une longue durée.

Dans le Tableau III ne figurent donc que les résultats obtenus sur une souche de 1 mois.

Nous remarquons, là aussi, l'activité particulière du mercurothiolate d'éthanolamine.

4. — Cas de la souche S 4 (Tableau IV) :

Cette souche a été prélevée, dans notre laboratoire, au niveau des culs-de-sac vaginaux. Il s'agit bien de *Trichomonas vaginalis* morphologiquement caractérisés.

Nous avons pu conserver cette souche pendant plusieurs années et il a été possible de l'acclimater sur d'autres milieux monophasiques et, en particulier, sur le milieu de Magara.

Le Tableau IV rend compte des résultats obtenus sur le milieu N de l'Institut Pasteur.

Discussion des résultats du Tableau IV

Dix-huit mois après sa mise en culture, on peut noter un léger renforcement de la résistance de la souche vis-à-vis des substances essayées.

De nouveau, nous remarquons la forte action du mercurothiolate d'éthanolamine.

Les écarts d'activité entre les différentes substances peuvent être comparés à ceux précédemment observés ; cependant, l'acétylaminonitrothiazole et le sulfate d'orthoxyquinoléine présentent ici une activité voisine de celle du mercurothiolate d'éthanolamine.

5. — *Cas d'une souche de Trichomonas intestinalis (Tabl. V) :*

Nous avons pu entretenir, pendant quelques mois, une souche de *Trichomonas intestinalis* qui nous avait été confiée par la Faculté.

Des essais ont été pratiqués sur cette souche, deux mois, puis quatre mois après sa mise en route sur le milieu N. Les résultats en sont très voisins (*).

Les rapports d'activité entre les différentes substances sont, dans l'ensemble, conservés. D'une manière générale, *Trichomonas intestinalis* apparaît assez résistant vis-à-vis des substances antiseptiques.

b) *Essais effectués sur les flagellés associés à un germe choisi (cultures pures mixtes) :*

Ces essais ont été pratiqués sur le milieu N de l'Institut Pasteur que nous avonsensemencé :

- avec un *Trichomonas vaginal* (souche S 1), en culture depuis plusieurs mois sur le milieu de Magara (souche pure) ;
- avec un germe choisi entretenu sur gélose inclinée.

Dans la pratique, on introduit dans le milieu diphasique la valeur d'une ôse de la culture microbienne, puis on ajoute trois à quatre gouttes de la suspension de *Trichomonas*.

Les essais ont été pratiqués sur une culture pure mixte entretenue depuis plus d'un mois.

Dans les Tableaux VI et VII figurent les résultats obtenus avec les associations : *Trichomonas vaginalis* + colibacille et *Trichomonas vaginalis* + staphylocoque blanc.

Discussion des résultats des Tableaux VI et VII

Nous avons pu conserver une association *Trichomonas vaginalis* + colibacille pendant plus d'un an, les flagellés ayant toujours fait preuve d'une bonne vitalité.

(*) Il ne nous a pas été possible d'entretenir *Trichomonas intestinalis* sur le milieu de Magara.

Nous remarquerons que la résistance moyenne de la souche S 1, associée au colibacille, diffère peu de celle de la même souche unie à sa flore d'origine. De plus, il apparaît que les différentes substances trichomonacides utilisées présentent, dans ce cas, des activités très voisines ; enfin, il faut ajouter que la résistance de la souche varie peu dans le temps, ce qui peut être porté à l'actif de la méthode.

L'association *Trichomonas vaginalis* + staphylocoque blanc a pu être facilement obtenue, mais l'abondance et la vitalité des flagellés n'ont jamais été aussi grandes que dans la première association.

Il nous a été possible d'effectuer trois séries d'essais dont les résultats, groupés dans le Tableau VII, appellent les mêmes commentaires que précédemment.

Dans tous les cas, nous remarquerons que la suppression du plan incliné modifie peu la résistance de la souche, les doses léthales étant toujours très voisines de celles qu'on obtient avec le milieu complet.

3°) Résultats des essais effectués sur le milieu monophasique de Johnson et Trussel dit « milieu C.P.L.M. » (Tableaux VIII et IX) :

Ces essais ont été pratiqués sur les souches S 1 et S 4 entretenues en permanence sur le milieu N de l'Institut Pasteur.

Les parasites ont été maintenus sans difficulté sur ce milieu monophasique, mais nous n'avons pu obtenir de cultures rigoureusement amicrobiennes malgré l'utilisation judicieuse d'antibiotiques.

On peut admettre, cependant, que ces expériences ont été conduites sur des cultures pratiquement pures.

Nous ne mentionnons, ici, que deux séries d'essais réalisés à trois mois d'intervalle, les souches n'ayant pu être conservées très longtemps sur ce milieu.

Discussion des résultats des Tableaux VIII et IX

En ce qui concerne la souche S 1, nous remarquerons que les résultats ont peu varié en six mois. Nous les rapprochons de ceux que nous avons obtenus sur le milieu N de l'Institut Pasteur.

L'absence presque totale des germes semble favoriser ici la stabilisation de la souche. Le mercurothiolate d'éthanolamine reste toujours le produit le plus efficace, les autres substances ayant entre elles des activités assez voisines.

Notons, fait paradoxal, l'augmentation, après six mois, de l'activité de la 4,7-phénanthroline 5,6-quinone.

Les résultats obtenus avec la souche S 4 sont assez aberrants et les chiffres réunis dans le Tableau IX traduisent mal l'activité respective des substances employées.

4°) Résultats d'essais effectués sur le milieu au thioglycollate (Tableaux X et XI) :

Comme on peut en juger par l'examen des Tableaux X et XI, les résultats obtenus avec ce milieu sont voisins de ceux fournis par le milieu C.P.L.M.

Ici aussi, on note un léger renforcement de la souche après quelques mois d'entretien sur le milieu considéré ; cette remarque est valable pour la souche S 1 aussi bien que pour la souche S 4.

Nous préférons le milieu au thioglycollate au milieu C.P.L.M. dont la préparation est longue et délicate ; ajoutons aussi que les souches entretenues sur le milieu de JOHNSON et TRUSSEL nous paraissent moins vivaces. Enfin, le milieu au thioglycollate a toujours fourni des résultats assez concordants.

5°) Résultats des essais effectués sur le milieu de Magara. (Tableaux XII, XIII, XIV et XV) :

Nous avons pu acclimater sur ce milieu les souches S 1, S 4, S 6 et S 8 qui sont toutes des souches de *Trichomonas vaginalis* morphologiquement caractérisées. Nous les avons entretenues, sans difficulté, pendant de longues durées, à l'état rigoureusement pur.

Toutes ces expériences ont été reproduites à des moments différents avec des concentrations variées de sérum sanguin.

Discussion des résultats des Tableaux XII, XIII, XIV et XV

L'examen de ces tableaux appelle certains commentaires qui présentent un intérêt particulier. En effet, les substances trichomonacides sont mises en contact avec des souches de *Trichomonas vaginalis* rigoureusement amicrobiennes, mais possédant, néanmoins, une forte vitalité et une grande aptitude à se multiplier.

Dans ces conditions, les résultats obtenus à différents moments ne sont pas influencés par les éventuelles variations de la flore microbienne, et on conçoit qu'ils expriment seulement la résistance de la souche de flagellés vis-à-vis de la substance toxique.

L'examen global des résultats permet de tirer les conclusions suivantes :

- a) *La nature de la souche et son ancienneté, au moment de l'implantation du flagellé sur le milieu de Magara, sont des facteurs dont il convient de tenir compte :*

On peut remarquer, en effet, que la souche S 1, qui a été cultivée au préalable, pendant de nombreuses années, sur le milieu de l'Institut Pasteur, conserve une sensibilité plus grande que les souches S 4, S 6 et S 8 qui ont pu être acclimatées sur le milieu monophasique après une courte période d'adaptation sur le milieu diphasique.

Comme il ressort de l'étude de ces tableaux, la souche S 1 est, en moyenne, cinq à dix fois moins résistante à l'action des substances utilisées que les autres souches plus récentes, cet écart persistant toujours après des examens répétés.

On comprend qu'il soit préférable d'utiliser des souches de flagellés relativement récentes car leur sensibilité n'est pas trop grande.

- b) *Constance des résultats dans le temps :*

Pour une même substance, les résultats varient au plus du simple au double, ce qui, pour un essai biologique, peut être considéré comme pratiquement identique.

Nous n'avons pas observé, d'autre part, de renforcement de la résistance des souches, comme c'est le cas avec la plupart des autres milieux.

- c) *Les différentes substances utilisées fournissent des résultats qui sont fonction de leur activité propre :*

Les écarts obtenus semblent suffisants pour sélectionner les substances essayées.

Remarquons, à ce propos, la parfaite stabilité des résultats donnés par le mercurothiolate d'éthanolamine (dose léthale : 10 microgrammes par ml pour toutes les souches récentes).

Les quelques essais effectués avec le métronidazole montrent que la concentration léthale de ce corps, particulièrement actif, se situe aux environs de 1 microgramme par ml (dix fois plus actif que le mercurothiolate d'éthanolamine) ; en revanche, la 4,7-phénanthroline 5,6-quinone a une très faible activité trichomonacide (dose léthale : 100 à 200 microgrammes par ml).

- d) *La concentration en sérum sanguin, dans les limites de 5 à 10 %, n'a qu'une faible influence sur la résistance des souches :*

Nous préconisons donc l'emploi d'une concentration sérieuse de 5 % qui suffit pour assurer la multiplication normale du flagellé sur le milieu de Magara et une bonne résistance des souches vis-à-vis des différentes substances à essayer.

INTERPRETATION GENERALE DES ESSAIS D'ACTIVITE
TRICHOMONACIDE EN TUBES
CHOIX D'UNE SUBSTANCE ÉTALON

Quelles conclusions d'ordre pratique peut-on tirer de l'examen global de ces résultats ?

Il nous paraît nécessaire de tenir compte des différents facteurs qui concourent à assurer la stabilité des résultats, critère qui confirme leur validité, et dont nous allons maintenant faire une rapide étude critique.

1°) Importance de la nature de la souche et de son ancienneté :

Chaque souche de *Trichomonas vaginalis* possède une résistance qui lui est propre et qu'on appréciera après une période d'entretien suffisante sur le milieu choisi. Les résultats les plus fantaisistes peuvent être obtenus si on effectue les essais avant cette période d'adaptation.

Compte tenu de cette remarque, il apparaît que les résultats d'essais pratiqués à différentes périodes et sur différentes souches se développant avec ou sans germes, n'offrent pas — les essais étant accomplis dans les mêmes conditions — de différences considérables.

Notons, toutefois :

a) que les résultats les plus reproductibles ont été obtenus avec des souches récentes que nous avons suivies dès leur mise en culture sur le milieu N de l'Institut Pasteur et dont nous avons exploré la sensibilité un an ou deux après leur départ.

b) qu'on observe, cependant, une légère augmentation de la résistance de la souche après quelques mois d'entretien sur le milieu d'origine.

c) que les essais pratiqués sur une souche fort ancienne (comme la souche S 1, entretenue depuis sept ans sur le milieu N) ne donnent pas des résultats aussi constants (cf. Tableau I).

2°) Le choix du milieu de culture revêt une importance particulière :

Nous avons vu, en effet, que l'utilisation du milieu de Magara, qui rend possible l'élimination totale de la flore perturbatrice, nous a permis d'obtenir des résultats reproductibles (cf. Tableaux XII, XIII, XIV et XV).

Le milieu N de l'Institut Pasteur, et même les milieux C.P.L.M. et au thioglycollate, qui ne nous ont pas permis l'entretien de cultures rigoureusement pures pendant de longues durées n'ont pas donné de résultats aussi satisfaisants.

3°) L'utilisation de la technique d'essai rapide décrite semble donner satisfaction :

Sa précision est aussi suffisante pour assurer la sélection des substances à essayer.

4°) La diminution de la concentration en sérum sanguin n'a jamais eu — quel que soit le milieu utilisé — une grande influence sur le résultat des essais.

Cependant, nous estimons qu'une concentration sérique de 5 % dans la phase liquide est nécessaire pour assurer une multiplication normale des flagellés.

*
**

En conclusion, nous proposons l'utilisation du milieu de Magara pour sélectionner les substances d'activité trichomonacide inconnue, avec la technique proposée d'inhibition au départ des cultures.

Dans ces conditions, en effet, les résultats obtenus nous semblent être directement fonction de la nature de la souche et de l'activité de la substance. Les garanties données par cette méthode sont, à notre sens, suffisantes pour assurer une sélection correcte des substances d'activités trichomonacides diverses.

Quelle substance pouvons-nous maintenant proposer comme étalon ? Il semble que le choix du mercurothiolate d'éthanolamine paraisse particulièrement indiqué.

Parmi les raisons qui nous ont incité à le proposer, citons entre autres : sa parfaite solubilité jointe à une présentation commerciale pratique, sa puissante activité trichomonacide, et surtout, la constance des résultats obtenus, en particulier avec le milieu de Magara.

Ajoutons, cependant, que des essais plus nombreux effectués avec le métronidazole nous auraient probablement conduit à proposer ce corps comme substance de référence. Doué d'une remarquable activité trichomonacide et parfaitement soluble, le métronidazole venait seulement d'être commercialisé à la fin de nos travaux, ce qui explique le peu de résultats mentionnés.

RÉSULTATS DES ESSAIS EFFECTUÉS SUR LE MILIEU N
DE L'INSTITUT PASTEUR

TABLEAU I

Souche S 1 (Trichomonas vaginalis + flore associée)

	Résultats sur souche de 6 ans	Résultats sur souche de 7 ans	Résultats sur souche de 8 ans	Résultats sur souche de 8 ans 1/2	Résultats sur souche de 8 ans (milieu sans phase solide)
Mercuriothiolate d'éthanolamine	10 µg par ml	10 µg par ml	5 µg par ml	2 µg par ml	2 µg par ml
Sulfate d'orthoxy- quinoléine	80 µg par ml	40 µg par ml	20 µg par ml	10 µg par ml	10 µg par ml
Bromure de cethexonium	40 µg par ml	80 µg par ml	40 µg par ml	20 µg par ml	10 µg par ml
Acétylaminonitro- thiazole	40 µg par ml	40 µg par ml	20 µg par ml	20 µg par ml	20 µg par ml
Trichomycine	20 µg par ml	10 µg par ml	20 µg par ml	10 µg par ml	10 µg par ml
4,7-phénanthroline 5,6-quinone		150 µg par ml	100 µg par ml	50 µg par ml	100 µg par ml

N.-B. — Nous rappelons que les concentrations indiquées correspondent aux doses léthales minimales pour chacun des produits étudiés.

TABLEAU II

Souche S 2 (Trichomonas vaginalis + flore associée)

	Résultats sur souche de 3 mois	Résultats sur souche de 6 mois	Résultats sur souche de 6 mois (milieu sans phase solide)	Résultats après un passage sur la Rate (souche de six mois)
Mercurothiolate d'éthanolamine .	5 µg par ml	10 µg par ml	5 µg par ml	10 µg par ml
Sulfate d'ortho- xyquinoléine ...	20 µg par ml	20 µg par ml	10 µg par ml	40 µg par ml
Bromure de cethexonium ...	40 µg par ml	40 µg par ml	40 µg par ml	150 µg par ml
Acétylamino- nitrothiazole ...	10 µg par ml	20 µg par ml	20 µg par ml	20 µg par ml
Trichomycine ..	20 µg par ml	20 µg par ml	10 µg par ml	40 µg par ml

TABLEAU III

Souche S 3 (Trichomonas vaginalis + flore associée)

	Résultats obtenus sur une souche d'un mois
Mercurothiolate d'éthanolamine	5 µg par ml
Sulfate d'orthoxyquino- léine	40 µg par ml
Bromure de cethexonium	20 µg par ml
Acétylaminonitrothiazole	20 µg par ml
Trichomycine	10 µg par ml
4,7-phénanthroline 5,6-quinone	80 µg par ml

TABLEAU IV

Souche S 4 (Trichomonas vaginalis + flore associée)

	Résultats sur souche de 3 mois	Résultats sur souche de 6 mois	Résultats sur souche de 9 mois	Résultats sur souche de 18 mois
Mercurothiolate d'éthanolamine	10 µg par ml	20 µg par ml	20 µg par ml	20 µg par ml
Sulfate d'ortho- xyquinoléine ..	20 µg par ml	50 µg par ml	20 µg par ml	50 µg par ml
Bromure de cethexonium ..	50 µg par ml	50 µg par ml	100 µg par ml	150 µg par ml
Acétylamino- nitrothiazole ..	20 µg par ml	50 µg par ml	20 µg par ml	50 µg par ml
Trichomycine ..	50 µg par ml	50 µg par ml	100 µg par ml	100 µg par ml
4,7-phénanthro- line 5,6-quinone	100 µg par ml	150 µg par ml	150 µg par ml	200 µg par ml

TABLEAU V

Souche de Trichomonas intestinalis + flore associée

	Résultats obtenus sur une souche de 2 mois	Résultats obtenus sur une souche de 4 mois
Mercurothiolate d'éthanolamine	20 µg par ml	20 µg par ml
Sulfate d'orthoxyquinoléine	40 µg par ml	40 µg par ml
Bromure de cethexonium	80 µg par ml	80 µg par ml
Acétylaminonitrothiazole	40 µg par ml	80 µg par ml
Trichomycine	40 µg par ml	40 µg par ml

TABLEAU VI

*Essais pratiqués sur l'association Trichomonas vaginalis
+ Escherichia coli*

	Résultats sur une association d'un mois	Résultats sur une association d'un mois (milieu sans plan incliné)	Résultats sur une association d'un an
Mercurothiolate d'éthanolamine .	5 µg par ml	2 µg par ml	10 µg par ml
Sulfate d'ortho- xyquinoléine	20 µg par ml	20 µg par ml	10 µg par ml
Bromure de cethexonium	40 µg par ml	40 µg par ml	20 µg par ml
Acétylaminonitro- thiazole	20 µg par ml	20 µg par ml	10 µg par ml
Trichomycine	20 µg par ml	10 µg par ml	10 µg par ml
4,7-phénanthroline 5,6-quinone	100 µg par ml	40 µg par ml	40 µg par ml

TABLEAU VII

*Essais pratiqués sur l'association Trichomonas vaginalis
+ Staphylococcus albus*

	Résultats sur une association d'un mois	Résultats sur une association d'un mois (milieu sans plan incliné)	Résultats sur une association de 9 mois
Mercurothiolate d'éthanolamine .	10 µg par ml	5 µg par ml	5 µg par ml
Sulfate d'ortho- xyquinoléine	10 µg par ml	10 µg par ml	5 µg par ml
Bromure de cethexonium	40 µg par ml	40 µg par ml	10 µg par ml
Acétylaminonitro- thiazole	20 µg par ml	10 µg par ml	5 µg par ml
Trichomycine	10 µg par ml	10 µg par ml	5 µg par ml
4,7-phénanthroline 5,6-quinone			20 µg par ml

ESSAIS EFFECTUÉS SUR MILIEU C.P.L.M.

TABLEAU VIII
Essais effectués sur la souche S 1

	Résultats obtenus après 3 mois	Résultats obtenus après 6 mois
Mercurothiolate d'éthanolamine	2 μg par ml	5 μg par ml
Sulfate d'orthoxyquinoléine	20 μg par ml	20 μg par ml
Bromure de cethexonium	10 μg par ml	20 μg par ml
Acétylaminonitrothiazole	10 μg par ml	20 μg par ml
Trichomycine	10 μt par ml	10 μg par ml
4,7-phénanthroline 5,6-quinone..	50 μg par ml	20 μg par ml

TABLEAU IX
Essais effectués sur la souche S 4

	Résultats obtenus après 3 mois	Résultats obtenus après 6 mois
Mercurothiolate d'éthanolamine.	5 μg par ml	10 μg par ml
Sulfate d'orthoxyquinoléine	20 μg par ml	20 μg par ml
Bromure de cethexonium	20 μg par ml	50 μg par ml
Acétylaminonitrothiazole	10 μg par ml	10 μg par ml
Trichomycine	10 μg par ml	20 μg par ml
4,7-phénanthroline 5,6-quinone..	50 μg par ml	50 μg par ml

ESSAIS EFFECTUÉS SUR MILIEU AU THIOLYCOLLATE

TABLEAU X

Essais effectués sur la souche S 1

	Résultats obtenus après 2 mois	Résultats obtenus après 5 mois
Mercuriothiolate d'éthanolamine.	5 μ g par ml	5 μ g par ml
Sulfate d'orthoxyquinoléine	20 μ g par ml	50 μ g par ml
Bromure de cethexonium	20 μ g par ml	50 μ g par ml
Acétylaminonitrothiazole	10 μ g par ml	10 μ g par ml
Trichomycine	20 μ g par ml	50 μ g par ml
4,7-phénanthroline 5,6-quinone..	50 μ g par ml	100 μ g par ml

TABLEAU XI

Essais effectués sur la souche S 4

	Résultats obtenus après 2 mois	Résultats obtenus après 6 mois
Mercuriothiolate d'éthanolamine.	5 μ g par ml	10 μ g par ml
Sulfate d'orthoxyquinoléine	10 μ g par ml	20 μ g par ml
Bromure de cethexonium	50 μ g par ml	50 μ g par ml
Acétylaminonitrothiazole	10 μ g par ml	20 μ g par ml
Trichomycine	20 μ g par ml	20 μ g par ml
4,7-phénanthroline 5,6-quinone..	100 μ g par ml	100 μ g par ml

RÉSULTATS DES ESSAIS EFFECTUÉS SUR LE MILIEU DE MAGARA ET COLL.

TABLEAU XII — *Essais sur la souche S 1 (souche pure)*

	Essais effectués après 3 mois		Essais effectués après 12 mois		Essais effectués après 18 mois	
	Concen- tration en sérum 5 %	Concen- tration en sérum 10 %	Concen- tration en sérum 5 %	Concen- tration en sérum 10 %	Concen- tration en sérum 5 %	Concen- tration en sérum 10 %
Mercurothiolate d'éthanolamine	1 µg par ml	2 µg par ml	2 µg par ml	5 µg par ml	2 µg par ml	2 µg par ml
Sulfate d'orthoxy- quinoléine	5 µg par ml	5 µg par ml	5 µg par ml	10 µg par ml	10 µg par ml	10 µg par ml
Bromure de cethexonium	5 µg par ml	10 µg par ml	10 µg par ml	10 µg par ml	5 µg par ml	10 µg par ml
Acétylamino- nitrothiazole	5 µg par ml	5 µg par ml	5 µg par ml	5 µg par ml	10 µg par ml	10 µg par ml
Trichomycine	5 µg par ml	5 µg par ml	5 µg par ml	5 µg par ml	5 µg par ml	10 µg par ml
4,7-phénanthroline 5,6-quinone	20 µg par ml	30 µg par ml	30 µg par ml	50 µg par ml	50 µg par ml	50 µg par ml

TABLEAU XIII — *Essais sur la souche S 4 (souche pure)*

	Essais effectués après 2 mois		Essais effectués après 6 mois		Essais effectués après 9 mois	
	Concen- tration en sérum 5 %	Concen- tration en sérum 10 %	Concen- tration en sérum 5 %	Concen- tration en sérum 10 %	Concen- tration en sérum 5 %	Concen- tration en sérum 10 %
Mercurothiolate d'éthanolamine ..	10 µg par ml	10 µg par ml	10 µg par ml	20 µg par ml	10 µg par ml	10 µg par ml
Sulfate d'orthoxy- quinoléine	50 µg par ml	100 µg par ml	20 µg par ml	20 µg par ml	50 µg par ml	50 µg par ml
Bromure de cethe- xonium	50 µg par ml	50 µg par ml	100 µg par ml	100 µg par ml	50 µg par ml	50 µg par ml
Acétylaminonitro- thiazole	20 µg par ml	20 µg par ml	20 µg par ml	20 µg par ml	50 µg par ml	50 µg par ml
Trichomycine	20 µg par ml	50 µg par ml	20 µg par ml	20 µg par ml	50 µg par ml	50 µg par ml
4,7-phénanthroline 5,6-quinone	100 µg par ml	100 µg par ml	150 µg par ml	150 µg par ml	150 µg par ml	200 µg par ml
Métronidazole					1,5 µg par ml	2 µg par ml

TABLEAU XIV — *Essais sur la souche S 6 (souche pure)*

	Essais effectués après 3 mois (concentration en sérum 5 %)	Essais effectués après 7 mois (concentration en sérum 5 %)
Mercurothiolate d'éthanolamine.	10 µg par ml	10 µg par ml
Sulfate d'orthoxyquinoléine	20 µg par ml	50 µg par ml
Bromure de cethexonium	25 µg par ml	25 µg par ml
Acétylaminonitrothiazole	20 µg par ml	10 µg par ml
Trichomycine	40 µg par ml	20 µg par ml
4,7-phénanthroline 5,6-quinone..	200 µg par ml	200 µg par ml
Métronidazole	1 µg par ml	1 µg par ml

TABLEAU XV — *Essais sur la souche S 8 (souche pure)*

	Essais effectués après 3 mois (concentration en sérum 5 %)	Essais effectués après 7 mois (concentration en sérum 5 %)
Mercurothiolate d'éthanolamine.	10 µg par ml	10 µg par ml
Sulfate d'orthoxyquinoléine	20 µg par ml	20 µg par ml
Bromure de cethexonium	10 µg par ml	20 µg par ml
Acétylaminonitrothiazole	10 µg par ml	5 µg par ml
Trichomycine	40 µg par ml	20 µg par ml
4,7-phénanthroline 5,6-quinone..	200 µg par ml	200 µg par ml
Métronidazole	1 µg par ml	1 µg par ml

CHAPITRE V

ESSAIS D'ACTIVITÉ TRICHOMONACIDE PRATIQUÉS EN CELLULES DE NAGEOTTE

Ce chapitre comprend deux parties :

1°) *Les techniques utilisées :*

a) Principe des méthodes par contact entre lame et lamelle et leurs inconvénients.

b) Avantages des essais en cellule.

c) Différentes manières de conduire les essais et description des techniques utilisées.

2°) *Résultats des essais en cellules et interprétation :*

Discussion générale et conclusion : critique de ces essais à la lumière des résultats obtenus.

A. — TECHNIQUES UTILISÉES POUR LES ESSAIS EN CELLULE

1°) Principe général de ces méthodes :

Le principe général de ces méthodes a déjà été donné, dans la première partie de ce travail, à propos des essais par contact direct entre lame et lamelle.

Rappelons qu'il consiste à mettre les protozoaires en contact, entre lame et lamelle, avec une concentration déterminée de substance à étudier.

Les préparations contenant différentes dilutions de la substance sont placées à l'étuve à 37°C accompagnées d'un témoin dont la survie est, dans ces conditions, de 7 à 8 heures.

Des contrôles effectués à intervalles réguliers permettent de juger de l'activité du produit, pour une concentration donnée, en fonction du temps de contact.

Dans la pratique, on place sur une lame une goutte de la suspension de flagellés, puis une goutte de la solution à essayer amenée à la concentration voulue. Le taux de dilution est ainsi dédoublé et les parasites se trouvent en contact avec une concentration par ml deux fois moins grande.

Chaque préparation est alors recouverte d'une lamelle qu'on lute à la paraffine, puis mise à incuber à 37°C pendant toute la durée de l'essai (environ 6 heures).

2°) Inconvénients des essais par contact direct entre lame et lamelle :

Citons en particulier :

a) Impossibilité de numérer les parasites :

Ce procédé, ne comportant pas l'utilisation de cellules de volume connu, ne permet pas de déterminer, après un temps donné, le pourcentage de flagellés vivants par rapport au nombre total de *Trichomonas* observés.

Nous verrons plus loin qu'il nous a été utile de connaître, avec une certaine approximation, le nombre de cellules mobiles qui persistent après des temps de contact variables.

b) Les flagellés étant en suspension dans une quantité très faible de liquide (2 gouttes), il est donc nécessaire de luter la préparation pour éviter sa dessiccation qui serait très rapide à 37°C.

3°) Avantages des essais en cellule :

Peu de modifications ont été apportées au principe général de la méthode d'essai.

Toutefois, l'utilisation de la cellule de NAGEOTTE appelle quelques commentaires :

Dans ces essais, nous avons recherché la mise au point d'une méthode rapide, standardisée et susceptible de donner une appréciation suffisante du pouvoir trichomonacide d'une substance ; de plus, la technique devrait permettre d'obtenir des résultats superposables lorsque les essais sont renouvelés après un laps de temps suffisant.

Dans ces conditions, les résultats sont, d'une façon générale, directement fonction de la souche et de la substance employée.

Cependant, il nous a semblé nécessaire de tenir compte dans ces essais du nombre des flagellés qui, dans chaque cellule, vont se trouver en contact avec la dilution de la substance essayée.

En effet, ce facteur ne peut être omis pour deux raisons principales :

a) On peut penser que le temps de contact qui va déterminer la mort de la totalité des flagellés, pour une concen-

tration donnée, sera plus long si le nombre des *Trichomonas* placés sur une cellule est très élevé.

Nous verrons plus loin que ce nombre peut varier d'un essai à l'autre, dans d'assez grandes proportions, sans que les résultats en soient sensiblement modifiés.

b) La technique suivie au début de nos travaux nécessitant une numération horaire des flagellés morts, il nous a semblé préférable d'effectuer toutes les numérations sur un nombre constant de parasites.

L'utilisation de la cellule de NAGEOTTE, pour ces essais par contact direct, semblait donc justifiée par les avantages qu'elle pouvait procurer. Ajoutons que le volume de liquide contenu dans une cellule est suffisant pour n'avoir pas à craindre une dessiccation rapide à 37°C, à condition toutefois de placer les cellules dans une chambre humide. Il n'est donc plus nécessaire de luter les préparations.

4°) Les techniques d'essai employées :

Nous avons utilisé deux techniques très voisines.

Elles se distinguent principalement par le mode d'expression des résultats. Nous allons brièvement commenter la première méthode et expliquer les raisons qui nous ont incité à l'abandonner au profit de la seconde qui sera décrite en détails.

PREMIÈRE TECHNIQUE D'ESSAI

Nous nous sommes servi de cultures mixtes sur milieu N de l'Institut Pasteur et de cultures pures sur milieu de Magara. Toutes ces cultures étant âgées d'environ 72 heures.

Par ailleurs, trois dilutions très différentes de chacune des substances à essayer ont été préparées (par exemple 10 μ g par ml - 50 μ g par ml - 100 μ g par ml).

Au moment de l'essai, on répartit chacune des dilutions d'une même substance à raison de 6 gouttes par cellule, puis on ajoute un volume égal de la suspension de *Trichomonas*. Le taux de dilution est ainsi dédoublé. Après avoir assuré le mélange de chaque suspension à l'aide de l'extrémité fermée d'une pipette Pasteur, les cellules sont recouvertes d'une lamelle, placées dans une chambre humide et maintenues à 37°C pendant six heures.

Toutes les heures, on procède à un contrôle microscopique et on note, pour chaque cellule, le pourcentage de parasites immobiles.

En général, on obtient, pour l'une des trois dilutions utilisées, la mortalité de la totalité des flagellés entre une heure et six heures de contact.

Si ces concentrations sont trop faibles, tous les flagellés restent vivants après six heures ; si elles sont trop fortes, tous sont immobilisés au cours de la première heure.

On doit refaire alors en moyenne quatre essais avec des dilutions voisines de celle qui a donné le résultat recherché, c'est-à-dire la mort des flagellés après un temps de contact de trois à quatre heures.

Pour qu'un essai soit valable, il importe que tous les parasites des cellules témoins soient mobiles après six heures de contact.

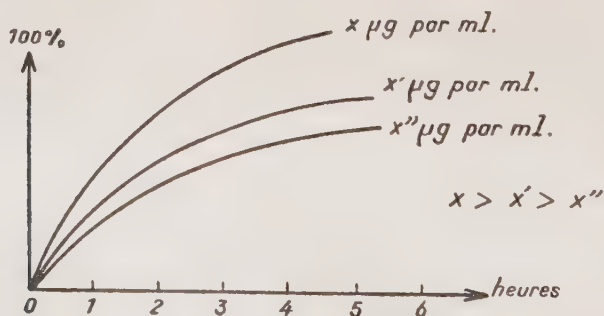
Etablissement des courbes de résultats :

Les résultats sont rapportés, sous forme de courbes, sur un système d'axes de coordonnées :

- en abscisses, on porte le temps de contact en heures (de 1 heure à 6 heures ;
- en ordonnées, le pourcentage d'éléments morts (de 0 à 100 %) ;
- sur chaque système d'axes de coordonnées, vont donc figurer quatre courbes qui correspondent aux quatre dilutions finales retenues.

Cette manière d'exprimer les résultats nous avait semblé rationnelle, car nous pensions, en commençant ces essais, que pour une concentration correcte de substance, le pourcentage de mortalité des flagellés augmenterait progressivement pendant toute la durée de l'expérience.

Nous pouvions donc espérer obtenir des courbes dont l'allure générale eût été la suivante :

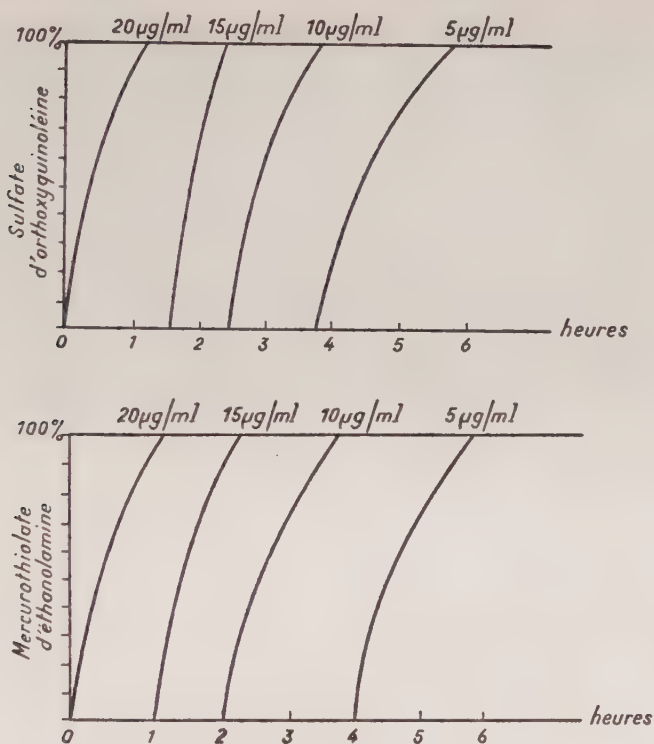


Malheureusement, de telles courbes n'ont été obtenues qu'occasionnellement.

En effet, nous avons remarqué que, pour une concentration suffisante de substance, la quasi totalité des parasites mourait

en un temps très limité (environ une à deux heures). Ajoutons que l'activité initiale du produit apparaît après un temps de contact qui est fonction de sa concentration.

Les courbes obtenues présentent donc l'allure générale suivante :



L'examen de ces courbes montre qu'avec une quantité suffisante de substance, 20 µg par ml par exemple, on observe pratiquement 100 % d'éléments morts au second contrôle, c'est-à-dire après une heure.

Avec une dilution légèrement moins concentrée, 10 µg par ml par exemple, les *Trichomonas* conservent une extrême vitalité après deux heures de contact, mais dans les deux heures qui suivent on assiste à la mort de la totalité des flagellés.

Si la concentration est encore plus faible (5 µg par ml), le même phénomène se reproduit entre la 4^e et la 6^e heure de contact.

Les parasites sont presque tous tués en un temps limité et le pourcentage de formes mobiles qui peuvent subsister est alors rarement supérieur à 10 %.

DEUXIÈME TECHNIQUE D'ESSAI

Ces remarques et l'allure des courbes obtenues nous ont obligé à abandonner ces expériences et nous avons pensé qu'il convenait mieux de rechercher les concentrations léthales de substance correspondant à différents temps de contact.

Le principe de la méthode consiste donc à déterminer la plus petite concentration de substance susceptible de provoquer la mort de la totalité des parasites en un temps donné.

On effectue alors plusieurs dilutions moins concentrées du corps à étudier qui vont correspondre aux concentrations léthales pour des temps de contact compris entre une heure et six heures.

Les résultats obtenus sont alors rapportés, comme précédemment, sur un système d'axes de coordonnées où l'on porte en abscisse les temps de contact (de une heure à six heures) et en ordonnée — au lieu d'un pourcentage croissant de mortalité — les doses léthales décroissantes en microgrammes par ml.

Cette méthode permet de définir l'activité des substances sur une souche, à un moment donné, par une courbe dont l'allure générale sera donnée plus loin.

Tous nos essais en cellule ont été conduits suivant cette méthode, mais nous avons présenté les résultats sous forme de tableaux, ce qui a permis de les concentrer et de faciliter les examens comparatifs.

Avant d'aborder l'étude de ces résultats, il convient de donner une description plus détaillée des différentes étapes de la technique d'essai. Comme pour les tests en tubes, nous distinguerons trois étapes :

Première étape : Dilution de la substance à essayer et répartition sur les cellules.

Deuxième étape : Préparation de la suspension de Trichomonas et répartition sur les cellules.

Troisième étape : Mise en route de l'essai et examen horaire pendant six heures. Expression des résultats.

PREMIÈRE ÉTAPE : *Dilution de la substance à essayer et répartition sur les cellules.*

1°) *Matériel utilisé :*

- Séries de tubes Pyrex bouchés au coton et stérilisés au four.
- Pipettes de 1 ml, 2 ml, 10 ml obturées au coton et stérilisées au four dans des cylindres métalliques.
- Erlenmeyers de 250 ml bouchés au coton et stérilisés comme précédemment (récipients destinés à recevoir de l'eau bi-distillée stérile).
- Séries de portoirs.
- Cellules de Nageotte.

2°) *Dilutions des solutions-mères d'antiseptiques et utilisation de ces dilutions dans le cadre des essais en cellule :*

En règle générale, nous avons fait usage des mêmes solutions-mères d'antiseptiques que pour les essais en tubes et les dilutions de ces solutions ont été préparées dans les mêmes conditions.

Toutefois, la solution-mère d'acétylaminonitrothiazole est à 400 μ g par ml et celle de la 4,7-phénanthroline 5,6-quinone à 300 μ g par ml.

Il nous a fallu fréquemment utiliser des dilutions au demi, au tiers ou au cinquième de dilutions au dixième de concentrations diverses.

Dans un premier temps, on prépare plusieurs dilutions de concentrations variées et on effectue l'essai préliminaire. La plus faible concentration ayant provoqué la mort des flagellés, en moins d'une heure, sera retenue.

Dans un deuxième temps, on accomplit un second essai avec des concentrations légèrement inférieures à cette dernière, ce qui permet de déterminer les concentrations léthales pour les temps de contact compris entre une heure et six heures (essai définitif).

Toutes ces opérations de dilution peuvent être présentées sous forme de tableaux, ce qui permet d'éviter les erreurs au cours des manipulations.

Il est évidemment tenu compte du fait que le taux de dilution est dédoublé sur les cellules où seront déposées 6 gouttes de la dilution choisie et 6 gouttes de la suspension de flagellés.

Les exemples précis suivants vont mettre en lumière le déroulement de ces opérations de dilution :

Présentation des opérations de dilution pratiquées lors des essais préliminaires et définitifs effectués pour déterminer l'activité trichomonacide du mercurothiolate d'éthanolamine et du sulfate d'orthoxyquinoléine vis-à-vis d'une souche de Trichomonas vaginalis en culture sur le milieu de Magara (souche S 8)

— Emploi du mercurothiolate d'éthanolamine :

Dilutions utilisées : solution-mère (M) 1 ml = 1 000 μg
 dilution (1) 1 ml = 100 μg
 dilution (2) 1 ml = 10 μg

Concentration par ml de la dilution sur la cellule pendant l'essai	Concentration par ml de la dilution employée	Dilution employée	Résultats des essais
— Essais préliminaires :			
10 μg par ml	20 μg par ml	dilution 1 diluée au 1/5 1 ml = 20 μg	mortalité = 100 % après 2 heures
25 μg par ml	50 μg par ml	dilution 1 diluée au 1/2 1 ml = 50 μg	mortalité = 100 % après 1 heure
50 μg par ml	100 μg par ml	dilution 1 1 ml = 100 μg	mortalité = 100 % après 1 heure
— Essais définitifs :			
25 μg par ml	50 μg par ml	dilution 1 diluée au 1/2	mortalité = 100 % après 1 heure
10 μg par ml	20 μg par ml	dilution 1 diluée au 1/5	mortalité = 100 % après 2 heures
5 μg par ml	10 μg par ml	dilution 2 1 ml = 10 μg	mortalité = 100 % après 3 heures
2,5 μg par ml	5 μg par ml	dilution 2 diluée au 1/2 1 ml = 5 μg	mortalité = 100 % après 4 heures

— Emploi du sulfate d'orthoxyquinoléine :

Dilutions utilisées : solution-mère (M) 1 ml = 10 000 μg
 dilution (1) 1 ml = 1 000 μg
 dilution (2) 1 ml = 100 μg
 dilution (3) 1 ml = 10 μg

Concentration par ml de la dilution sur la cellule pendant l'essai	Concentration par ml de la dilution employée	Dilution employée	Résultats des essais
— <i>Essais préliminaires</i> :			
10 μg par ml	20 μg par ml	dilution 2 diluée au 1/5 1 ml = 20 μg	mortalité = 95 % après 3 heures
25 μg par ml	50 μg par ml	dilution 2 diluée au 1/2 1 ml = 50 μg	mortalité = $\sim$ 90 % après 2 heures
50 μg par ml	100 μg par ml	dilution 2 1 ml = 100 μg	mortalité = 100 % après 1 heure
— <i>Essais définitifs</i> :			
50 μg par ml	100 μg par ml	dilution 2	mortalité = 100 % après 1 heure
25 μg par ml	50 μg par ml	dilution 2 diluée au 1/2	mortalité = 90 % après 2 heures
10 μg par ml	20 μg par ml	dilution 2 diluée au 1/5	mortalité = 95 % après 3 heures
5 μg par ml	10 μg par ml	dilution 3 1 ml = 10 μg	mortalité = 100 % après 4 heures

La répartition des dilutions sur les cellules s'effectue à la pipette Pasteur. On dépose sur chaque cellule 6 gouttes de la dilution choisie et on y ajoute 6 gouttes de la suspension de flagellés.

On mélange ensuite à l'aide d'une fine baguette de verre et on recouvre le tout avec une lamelle épaisse.

Une cellule témoin ne contenant pas d'antiseptique accompagne obligatoirement chaque série d'essais.

DEUXIÈME ÉTAPE : *Préparation de la suspension de Trichomonas et répartition sur les cellules.*

Principe :

On effectue une culture de flagellés sur le milieu choisi pour les essais. Après trois jours d'incubation à 37°, la culture est mise en suspension dans le milieu, dans les conditions indiquées pour les essais en tubes.

Après une numération de contrôle, on dilue si nécessaire la suspension de flagellés afin que leur nombre soit compris entre certaines limites.

Cette dernière suspension sera alors répartie sur les cellules à raison de 6 gouttes par cellule.

Technique :

72 heures avant l'essai, on ensemence deux à trois tubes du milieu contenant un volume déterminé de phase liquide (5 ml s'il s'agit du milieu N de l'Institut Pasteur ; 10 ml s'il s'agit du milieu C.P.L.M., du milieu au thioglycollate ou du milieu de Magara).

Si l'on utilise le milieu N de l'Institut Pasteur, on prendra soin d'utiliser des tubes contenant de très faibles quantités d'amidon de riz, ce dernier gênant la numération des flagellés à l'hémocytomètre.

Nous avons utilisé, pour ces numérations, la cellule de NAGEOTTE, dont les caractéristiques ont été données au chapitre précédent. Rappelons que la contenance de la cellule au niveau du quadrillage est de 50 mm³, chaque bande ayant un volume de 1,25 mm³.

Mise en suspension des flagellés

Nous distinguerons deux cas :

a) *Cas du milieu N de l'Institut Pasteur* (5 ml de phase liquide par tube) :

On retire stérilement 3 ml de phase liquide, puis les flagellés sont mis en suspension, par simple agitation, dans les deux derniers ml.

b) *Cas des autres milieux utilisés* (10 ml de phase liquide par tube) :

On retire 5 ml de milieu avant de mettre les *Trichomonas* en suspension dans le liquide restant.

Numération à l'hémocytomètre

Quelques gouttes de chaque suspension sont déposées sur des cellules de NAGEOTTE et on numère approximativement, au micro-

scope, les flagellés contenus dans deux bandes de 1,25 mm³. On rapporte ensuite au mm³.

Le nombre des parasites varie dans ces conditions entre 500 et 2 000 par mm³, la suspension contenant par conséquent de 500 000 à 2 000 000 de cellules par ml.

Si le nombre des *Trichomonas* dépasse largement 2 000 par mm³, on effectue une dilution de la suspension.

Les 6 gouttes de suspension qui seront déposées sur chaque cellule, au moment de l'essai, contiennent donc de 75 000 à 300 000 flagellés (4 gouttes versées à la pipette Pasteur correspondent sensiblement à 1/10^e de ml).

Des essais comparatifs pratiqués avec des inoculums différents, mais compris dans les limites indiquées plus haut, ont donné des résultats identiques.

Nous pouvons donc faire observer, pour conclure, que les résultats de ces essais en cellule ne sont pas fonction du nombre de *Trichomonas* mobilesensemencés, ceci, tout au moins, dans certaines limites.

Ce fait, que nous avons déjà signalé à propos des essais en tubes, évite à l'expérimentateur d'effectuer une numération rigoureuse et les opérations qui en découlent s'en trouvent ainsi simplifiées.

Cette deuxième étape de ces essais peut être ainsi réalisée rapidement, ce qui est avantageux pour une méthode destinée à la sélection de substance dont l'activité trichomonacide est inconnue.

TROISIÈME ÉTAPE :

- Mise en route de l'essai,
- Pratique des contrôles horaires,
- Expression des résultats.

La répartition des dilutions de la substance à essayer étant faite, on ajoute un volume égal de la suspension de flagellés, on mélange et on recouvre chaque cellule d'une lamelle épaisse.

Les cellules sont alors disposées dans un bac en plexiglass contenant une petite quantité d'eau. Ce récipient joue le rôle de chambre humide et est placé à l'étuve à 37° pendant toute la durée de l'essai.

La vitalité des flagellés et leur dispersion correcte doivent être contrôlées sur toutes les cellules avant le début de l'épreuve.

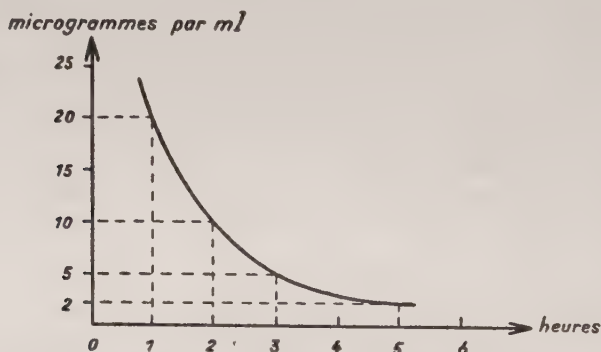
L'examen des cellules sera pratiqué toutes les heures, pendant six heures, dans le minimum de temps.

Seules les doses minimales léthales seront retenues.

Elles correspondent à la mort de 90 à 100 % des flagellés après un temps donné.

Les résultats peuvent être rapportés, comme il a été dit, sur des systèmes d'axes de coordonnées.

En abscisse figurent les temps de contact et en ordonnée les concentrations léthales correspondantes. L'allure générale des courbes obtenues est la suivante :



Action du mercurothiolate d'éthanolamine sur la souche S 6 âgée de trois mois, en culture sur milieu de Magara.

Cependant, nous avons jugé préférable de présenter nos résultats sous forme de tableaux, ce qui nous a permis de les rassembler et aussi de faciliter leur comparaison.

B. — LES RESULTATS.

1°) Généralités :

Comme pour les essais en tubes, les résultats, présentés sous forme de tableaux, sont groupés en fonction du milieu utilisé. C'est ainsi que nous distinguerons :

a) Les essais pratiqués sur des flagellés en culture sur le milieu de N de l'Institut Pasteur.

b) Les essais effectués sur des flagellés se multipliant sur le milieu C.P.L.M. de JOHNSON et TRUSSEL.

c) Les essais pratiqués sur des parasites en culture sur le milieu au thioglycollate.

d) Enfin, les essais réalisés sur des *Trichomonas* se développant sur le milieu de MAGARA.

La plupart de ces expériences en cellule de NAGEOTTE ont été pratiquées sur différentes souches de *Trichomonas vaginalis* et reproduites, au cours du vieillissement de la souche, sur le milieu considéré.

L'âge de la culture sur le milieu au moment de l'essai a toujours été mentionné sur chacun des tableaux.

Les concentrations léthales indiquées correspondent à la mort de la quasi-totalité des parasites observés (à 5 ou 10 % près).

Tous ces essais ont été contrôlés le jour même ou le lendemain du jour du premier essai et les résultats obtenus se sont montrés identiques aux précédents, sinon très voisins.

2°) Concentrations léthales de différentes substances pour *Trichomonas vaginalis* (souches en culture sur milieu N de l'Institut Pasteur) :

I. — CAS DE CULTURES MIXTES

a) Essais pratiqués sur la souche S 1 (Tableau I) :

Il ressort du Tableau I que le mercurothiolate d'éthanolamine a une forte activité trichomonacide, 5 μ g par ml de cette substance provoquant la mort de 95 % des flagellés en cinq heures de contact. Ajoutons que les mêmes essais effectués sur ce même

corps, deux années plus tard, ont donné des résultats très voisins, compte tenu de la sensibilité générale de la méthode.

L'activité de la trichomycine se rapproche beaucoup de celle du mercurothiolate d'éthanolamine.

Le sulfate d'orthoxyquinoléine et le bromure de cethexonium ont des actions presque identiques et se révèlent en moyenne deux fois moins actifs par cette méthode que les deux premières substances (doses léthales : 10 μg par ml après six heures).

Enfin, la 4,7-phénanthroline 5,6-quinone, et surtout l'acétylaminonitrothiazole, se sont montrés très peu actifs dans ces conditions expérimentales (doses léthales : de 20 à 50 μg par ml après six heures).

Dans tous les cas, la souche semble légèrement plus sensible dans la seconde série d'essais. Nous avons déjà signalé cette augmentation de la sensibilité de la souche S 1, au cours du vieillissement, à propos des essais en tubes.

b) Essais pratiqués sur la souche S 2 (Tableau II) :

Cette souche n'ayant pu être conservée pendant une très longue durée, nous n'avons retenu que la série d'expériences effectuées six mois après son passage sur le milieu N.

Les résultats obtenus s'éloignent assez souvent des précédents, nous noterons en particulier :

- la plus grande résistance de la souche S 2 vis-à-vis du mercurothiolate d'éthanolamine ;
- des résultats presque identiques en ce qui concerne le bromure de cethexonium ;
- de nouveau, la faible activité de l'acétylaminonitrothiazole.

c) Essais pratiqués sur la souche S 4 (Tableau III) :

Des essais ont été pratiqués sur cette souche après trois mois, puis après un an d'entretien sur le milieu N.

Si l'on considère les résultats obtenus après trois heures de contact, nous remarquerons :

- pour le mercurothiolate d'éthanolamine, concentration léthale 10 μg par ml ;
- pour le sulfate d'orthoxyquinoléine : le bromure de cethexonium et la trichomycine, concentration léthale 20 μg par ml (activité deux fois plus faible) ;
- pour la 4,7-phénanthroline 5,6-quinone, concentration léthale 80 μg par ml ;
- pour l'acétylaminonitrothiazole, concentration léthale 150 μg par ml.

Par cette méthode, les deux dernières substances se révèlent, là aussi, très peu actives.

Les résultats des essais effectués après un an offrent peu de différence avec les précédents. Nous noterons tout au plus un très léger renforcement de la résistance de la souche.

II. — CAS DE CULTURES PURES MIXTES

a) Essais pratiqués sur l'association *Trichomonas vaginalis* + *E. coli* (Tableau IV) :

Nous avons retenu les résultats d'essais obtenus après six mois d'entretien sur le milieu N de l'Institut Pasteur.

Après trois heures de contact, la concentration léthale est de 8 μg par ml pour le mercurothiolate d'éthanolamine, d'environ 80 μg par ml pour le sulfate d'orthoxyquinoléine (activité dix fois moindre) et de 100 μg par ml pour le bromure de cethexonium et l'acétylaminonitrothiazole. Par contre, la 4,7-phénanthroline 5,6-quinone et la trichomycine agissent en trois heures à la concentration d'environ 40 μg par ml.

Comme il ressort de l'examen du Tableau IV, ces résultats sont en discordance avec ceux précédemment mentionnés et il devient alors difficile de juger de l'activité propre de chacune des substances essayées.

Fait paradoxal, le bromure de cethexonium présente ici une faible activité trichomonacide ; par contre, la 4,7-phénanthroline 5,6-quinone a, dans cet essai, une activité voisine de celle de la trichomycine, substance reconnue comme étant fortement trichomonacide.

b) Essais pratiqués sur l'association *Trichomonas vaginalis* + *Staphylococcus albus* (Tableau V) :

Ces essais ont, là aussi, été effectués sur une association de six mois. Le mercurothiolate d'éthanolamine se montre toujours doué de fortes propriétés trichomonacides (dose léthale : 6 μg par ml après trois heures de contact).

L'action du sulfate d'orthoxyquinoléine et du bromure de cethexonium se rapproche de celle que nous avons pu mettre en évidence dans les premiers essais décrits (doses léthales : 40 μg par ml après trois heures de contact).

3°) Concentrations léthales de différentes substances pour *Trichomonas vaginalis* (Souches en culture sur le milieu C.P.L.M.) :

a) Cas de la souche S 1 (Tableau VI) :

Les essais en cellules de Nageotte ont été effectués sur une souche de *Trichomonas vaginalis* en culture sur le milieu C.P.L.M.

depuis trois mois. Les expériences ont pu être répétées après quinze mois d'entretien sur ce milieu. Les cultures étaient extrêmement pauvres en germes au moment des essais.

Si l'on considère les résultats rassemblés après un temps de contact d'environ trois heures, on peut noter :

- la forte activité trichomonacide du mercurothiolate d'éthanolamine (dose léthale : 6 μg par ml) ;
- l'activité trichomonacide plus faible du sulfate d'orthoxyquinoléine, du bromure de cethexonium et de la trichomycine (doses léthales : de 20 à 30 μg par ml) ;
- l'activité encore plus faible de l'acétylaminonitrothiazole et de la 4,7-phénanthroline 5,6-quinone (doses léthales : environ 40 μg par ml après trois heures pour ces deux dernières substances).

Les résultats obtenus après quinze mois sont assez voisins des précédents. Il ne semble pas y avoir de renforcement de la résistance de la souche.

b) *Cas de la souche S 4 (Tableau VII) :*

A l'examen du Tableau VII, on remarque comme précédemment :

- la forte activité du mercurothiolate d'éthanolamine ;
- l'activité trichomonacide plus faible du sulfate d'orthoxyquinoléine, du bromure de cethexonium et de la trichomycine dont les doses léthales, après un temps de contact identique, sont très voisines ;
- la faible action sur les flagellés de l'acétylaminonitrothiazole et de la 4,7-phénanthroline 5,6-quinone.

Nous noterons que les résultats recueillis se rapprochent beaucoup de ceux que nous avons commentés pour la souche S 1.

Les essais renouvelés sur une association de six mois ne révèlent pas d'augmentation notable de la résistance de la souche.

4°) **Concentrations léthales de différentes substances pour *Trichomonas vaginalis* (souches en culture sur le milieu au thio-glycollate) :**

a) *Cas de la souche S 1 (Tableau VIII) :*

Pour un temps de contact de trois heures, les résultats sont très voisins de ceux que nous avons obtenus sur le milieu C.P.L.M., dans les mêmes conditions, et pour la même souche.

L'activité du mercurothiolate d'éthanolamine est toujours sensiblement la même après trois heures (dose léthale : 8 μg par ml).

Le sulfate d'orthoxyquinoléine, le bromure de cethexonium, l'acétylaminonitrothiazole et la trichomycine ont entre eux des activités léthales très voisines (doses léthales : de 15 à 30 μg par ml après trois heures).

Seule, la 4,7-phénanthroline 5,6-quinone se révèle peu active (dose léthale : 60 μg par ml après trois heures).

Les essais répétés sur une souche de quinze mois ont donné des résultats sensiblement identiques.

b) *Cas de la souche S 4 (Tableau IX) :*

Ici encore, nous pouvons rapprocher les résultats des essais pratiqués sur une souche de trois mois de ceux obtenus sur le milieu C.P.L.M. dans les mêmes conditions.

Nous noterons toutefois :

- la forte activité trichomonacide de la trichomycine, qui est ici la même que celle du mercurothiolate d'éthanolamine (dose léthale : 8 μg par ml après trois heures).
- la faible activité de l'acétylaminonitrothiazole et de la 4,7-phénanthroline 5,6-quinone (doses léthales : 40 μg par ml pour ces deux substances après trois heures de contact).

Ces derniers produits se révèlent d'ailleurs légèrement plus actifs sur le milieu au thioglycollate que sur le milieu C.P.L.M.

Les résultats des essais pratiqués sur une souche de six mois, entretenue sur le milieu au thioglycollate, s'écartent peu de ceux que nous venons de mentionner.

5°) **Concentrations léthales de différentes substances pour *Trichomonas vaginalis* (souches en culture sur le milieu de Magara) : essais sur cultures pures :**

a) *Cas de la souche S 1 (Tableau X) :*

Il ressort de l'examen du tableau X que le mercurothiolate d'éthanolamine, le sulfate d'orthoxyquinoléine et la trichomycine ont une activité trichomonacide satisfaisante (doses léthales moyennes : 20 μg par ml après une heure de contact).

Le bromure de cethexonium est légèrement moins actif. (Dose léthale après une heure : 50 μg par ml.)

L'acétylaminonitrothiazole présente peu d'activité trichomonacide, il en est de même de la 4,7-phénanthroline 5,6-quinone (doses léthales : 100 μg par ml après une heure de contact).

Si nous rapprochons ces résultats de ceux que nous avons mentionnés à propos des essais en tubes correspondants, nous constaterons que les activités respectives des substances utilisées peuvent être mises en parallèle dans les deux méthodes d'essais. Une exception est à signaler en ce qui concerne l'acétylaminonitrothiazole qui se montre paradoxalement vingt à trente fois moins actif dans ces essais en cellule.

Ces expériences, renouvelées après dix-huit mois, ont donné des résultats sensiblement identiques, qui appellent les mêmes commentaires.

D'une manière générale, les différentes substances essayées (exception faite pour l'acétylaminonitrothiazole) ont donné des activités trichomonacides très voisines.

b) *Cas de la souche S 4 (Tableau XI) :*

L'utilisation d'une souche de *Trichomonas vaginalis* d'implantation récente sur le milieu N ne fait pas apparaître de modifications importantes de la résistance des flagellés en culture sur le milieu de Magara, dans les conditions expérimentales de ces essais.

Si l'on excepte l'acétylaminonitrothiazole et la 4,7-phénanthroline 5,6-quinone, dont les activités trichomonacides restent faibles, on voit que les autres substances présentent une bonne activité sur les flagellés, les doses léthales demeurant, d'ailleurs, très proches de celles que nous avons obtenues avec la souche S 1.

Cette souche nous a aussi permis de faire l'essai d'une substance de découverte récente : le métronidazole. Fait paradoxal, cette substance extrêmement active (cf. essais en tubes) s'est avérée, dans ces essais, d'une efficacité relativement faible sur les flagellés (dose léthale : 50 μg par ml après une heure de contact).

c) *Cas de la souche S 6 (Tableau XII) :*

Nous avons pratiqué sur cette souche une série d'essais après trois mois.

Nous remarquerons de nouveau la faible action trichomonacide de l'acétylaminonitrothiazole (dose léthale après une heure de contact : 200 μg par ml) et de la 4,7-phénanthroline 5,6-quinone (dose léthale : 180 μg par ml après une heure).

Le métronidazole se révèle assez peu actif (dose léthale : 80 μg par ml après une heure de contact) ainsi que la trichomycine (dose léthale : 100 μg par ml après une heure).

d) *Cas de la souche S 8 (Tableau XIII) :*

Les résultats obtenus avec cette souche vont dans le sens de ceux que nous venons de commenter à propos des autres souches.

Le mercurothiolate d'éthanolamine demeure la substance la plus active ; l'acétylaminonitrothiazole et la 4,7-phénanthroline 5,6-quinone, les substances les moins actives.

Le métronidazole possède ici une efficacité modérée, très voisine de celles du sulfate d'orthoxyquinoléine, du bromure de cethexonium et de la trichomycine.

Discussion des résultats : Critique de ces essais en cellule

Il nous faut maintenant apprécier l'intérêt pratique présenté par les essais en cellule ; en effet, les commentaires que nous venons d'apporter à propos de chacun des tableaux de résultats montrent que leur valeur est discutable.

Nous avons décrit, au début de ce chapitre, une méthode d'essai que nous avons cherché à standardiser tout en la simplifiant ; mais le principe même du contact direct flagellé + substance antiseptique permet-il d'obtenir des résultats satisfaisants ?

Nous avons vu qu'une méthode d'essai en cellule devait permettre, non seulement de retrouver des résultats voisins à des intervalles de temps plus ou moins éloignés, mais aussi de juger de l'activité respective des substances essayées. Par ailleurs, il semble logique que les différents produits utilisés présentent respectivement des activités comparables à celles que nous avons obtenues dans les essais en tubes.

Si la première condition semble acquise — la plupart des résultats mentionnés dans ces essais étant reproductibles, dans le temps, avec des différences acceptables en biologie — il ne semble pas que l'activité propre à chacun des produits utilisés soit toujours parfaitement reproduite.

Cette remarque est valable, non seulement pour les tests accomplis sur des flagellés issus de cultures mixtes, mais aussi pour les essais qui utilisent des parasites en provenance de cultures pures.

Nous allons apporter quelques précisions à ce sujet en comparant les activités des différentes substances essayées à celles que nous avons obtenues pour les essais en tubes correspondants.

MERCUROTHIOLATE D'ETHANOLAMINE :

Cette substance présente dans tous les essais en cellule une forte activité trichomonacide.

La dose létale, après une heure de contact, varie peu : de 10 à 20 μg par ml en moyenne.

Ainsi, avec les deux techniques d'essais, les résultats sont donc comparables et confirment l'activité trichomonacide du produit.

SULFATE D'ORTHOXYQUINOLEINE :

Son activité trichomonacide oscille, après une heure de contact, aux environs de 50 μg par ml.

Il est donc deux fois moins actif que le corps précédent. Nous retrouvons, en général, cette différence dans les essais en tubes.

BROMURE DE CETHEXONIUM :

Activité trichomonacide moyenne, après une heure de contact : 50 μg par ml. Mais nous observons fréquemment avec cette substance des résultats plus faibles ou plus forts suivant les cas (variations de 25 à 150 μg par ml).

Les résultats des essais en tubes sont plus constants. L'activité du bromure de cethexonium apparaît alors en général deux fois plus faible que celle du sulfate d'orthoxyquinoléine.

ACETYLAMINONITROTHIAZOLE :

Dans les essais en tubes, ce corps a une activité trichomonacide voisine de celle du sulfate d'orthoxyquinoléine.

Dans les essais en cellule, il a toujours présenté une faible action sur les flagellés (les doses léthales après une heure de contact varient d'ailleurs suivant les souches ou les milieux dans des limites assez larges : de 30 μg par ml à 250 μg par ml).

Les essais en cellule ne donnent donc pas, en ce qui concerne cette substance, de résultats valables et nous essayerons, plus loin, d'en expliquer la raison.

TRICHOMYCINE :

Son activité trichomonacide est à mettre en parallèle avec celle du sulfate d'orthoxyquinoléine, la dose léthale moyenne étant d'environ 30 μg par ml.

L'examen des tableaux montre toutefois que l'activité de la trichomycine peut présenter d'assez grandes variations. Cette action est comparable à celle que nous avons mise en évidence par la méthode d'inhibition au départ des cultures.

4,7-PHENANTHROLINE 5,6-QUINONE :

L'inactivité de ce produit, déjà démontrée par les essais en tubes, est confirmée par les essais en cellule.

Signalons, cependant, la discordance assez fréquente des résultats, la 4,7-phénanthroline 5,6-quinone se révélant, dans certaines séries d'essais, presque aussi active que le sulfate d'orthoxyquinoléine et le bromure de cethexonium (cf. Tableaux I, IV, V et VIII).

METRONIDAZOLE :

Nous avons déjà fait remarquer que cette substance, douée d'une activité trichomonacide considérable (cf. essais en tubes),

présentait dans les essais en cellule une action trichomonacide comparable à celle du sulfate d'orthoxyquinoléine ou du bromure de cethexonium, c'est-à-dire d'intensité moyenne. Nous chercherons à en élucider la cause ultérieurement.

**

Cette rapide étude critique des résultats de nos essais va nous permettre d'apporter quelques conclusions relatives à l'intérêt de la méthode et à la valeur des résultats qu'elle procure.

Nous avons dit que le principe même de la technique consiste à mettre les flagellés en contact avec une concentration déterminée de la substance pendant une durée ne dépassant pas six heures.

Dans ces conditions, on comprend que les parasites et la substance à essayer soient les deux facteurs prépondérants.

En revanche, la nature du milieu de culture et la flore associée ne semblent pas intervenir pour une grande part dans ces essais.

En ce qui concerne *le rôle du milieu de culture* pendant l'essai, il convient de faire observer :

a) qu'il s'agit du milieu où se sont multipliés les *Trichomonas* et non d'un milieu neuf, comme c'est le cas pour les essais en tubes ;

b) que ce milieu, dilué dans la solution d'antiseptique, n'aura qu'un rôle négligeable pour la conservation des flagellés et ne permettra, en aucun cas, leur multiplication.

Quant à la *flore associée*, elle ne peut, dans les conditions de l'essai, renforcer la vitalité des parasites. On conçoit, par conséquent, que le milieu de Magara, qui permet l'obtention de cultures pures, ne puisse apporter ici la solution du problème.

La résistance de *Trichomonas vaginalis*, associé ou non à sa flore, sera donc dans ces expériences directement fonction de la concentration en antiseptique utilisé.

Cependant, malgré l'élimination des différents éléments perturbateurs, que nous avons cherché à neutraliser dans les essais en tubes, les résultats semblent prouver que la méthode d'essai en cellule n'apporte pas entièrement satisfaction, et ceci pour trois raisons principales :

a) d'une manière générale, les différences observées dans les résultats d'essais effectués avec des produits différents ne paraissent pas suffisantes pour que la technique permette une discrimination nette de substances d'activités trichomonacides voisines.

b) Les résultats des essais sont, dans l'ensemble, peu constants. On observe fréquemment de larges variations, pour une même substance, suivant les milieux utilisés ou les souches. Les résultats obtenus ne sont pas, dans tous les cas, parallèles à ceux des essais en tubes correspondants.

c) Les substances essayées fournissent des résultats qui ne sont pas toujours en accord avec leur activité propre, activité d'ailleurs contrôlée par les essais en tubes (citons, à ce propos, le cas de l'acétylaminonitrothiazole et du métronidazole, paradoxalement peu actifs dans les essais en cellule).

Ces différentes remarques tendent donc à diminuer l'intérêt de la technique d'essais sous la forme où nous l'avons présentée.

De plus, il semble difficile, *a priori*, d'apporter l'explication de cette instabilité des résultats et de la faible activité de certains produits dans les conditions de l'essai.

Cependant, il nous a paru utile de nous attarder quelque peu sur le cas de l'acétylaminonitrothiazole et sur celui du métronidazole.

En effet, nous pouvons émettre l'hypothèse que certaines substances, douées de fortes propriétés trichomonacides, n'agissent, avec une efficacité maximale sur les flagellés, qu'après un temps de contact suffisant.

Si l'on utilise des méthodes d'essais dans lesquelles la durée de contact est faible — et c'est le cas des essais en cellule — l'activité véritable de ces substances ne sera pas exprimée d'une manière exacte.

Dans ces essais, tout se passe comme si, pendant le court temps de contact, les substances à action lente ne parvenaient pas à exercer pleinement cette action, contrairement à ce qui se manifeste dans les essais en tubes de durée prolongée.

Cette observation nous paraît valable pour l'acétylaminonitrothiazole et le métronidazole dont les concentrations léthales, après 5 à 6 heures de contact, rejoignent souvent celles de corps d'activité trichomonacide moyenne, tel le bromure de cethexonium.

Il faut donc tenir compte du fait que certaines substances trichomonacides pénètrent plus lentement que d'autres à travers la membrane cellulaire et c'est vraisemblablement le cas pour l'acétylaminonitrothiazole et le métronidazole qui ont d'ailleurs une structure chimique voisine.

On remarque, en effet, dans la formule de ces corps, la présence de noyaux pentagonaux (thiazole et imidazole) qui se différencient essentiellement par la substitution d'un atome de soufre à un atome d'azote.

Ces deux noyaux sont également porteurs d'une fonction nitrée.

Ajoutons, pour terminer cet exposé, que l'utilisation de solvants atoxiques, comme le polyéthylène-glycol, favorise la dispersion de certaines substances et probablement aussi leur pénétration intra-cellulaire. Ainsi, des essais *in vitro*, exécutés dans ce laboratoire, ont montré que l'emploi du Tween 80 augmentait sensiblement le pouvoir trichomonacide du métronidazole.

RÉSULTATS DES ESSAIS EFFECTUÉS EN CELLULES DE NAGEOTTE

TABLEAU I

CONCENTRATIONS LETHALES DE DIFFERENTES
SUBSTANCES POUR TRICHOMONAS VAGINALIS

(Milieu N de l'Institut Pasteur - Souche S 1)

ESSAIS SUR CULTURE MIXTE

Substances à essayer	Age de la culture sur milieu N	Concentrations léthales en microgrammes/ml					
		1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h
Mercurothiolate d'éthanolamine	6 ans	15		10		5	
	8 ans	20	10	5			
Sulfate d'orthoxyquinoléine ...	6 ans	70		40		20	10
	8 ans	40		20	10		
Bromure de cethexonium	6 ans	50		30			10
	8 ans	50	30	20			10
Acétylaminonitrothiazole	6 ans	200	150	100			50
	8 ans	150	100		50		20
Trichomycine	6 ans	20			10		5
	8 ans	20		10	5		
4,7-phénanthroline 5,6-quinone	6 ans	80			40		20
	8 ans	80		40			20

TABLEAU II

**CONCENTRATIONS LETHALES DE DIFFERENTES
SUBSTANCES POUR TRICHOMONAS VAGINALIS**

(Milieu N de l'Institut Pasteur - Souche S 2)

ESSAIS SUR CULTURE MIXTE

Substances à essayer	Age de la culture sur milieu N	Concentrations léthales en microgrammes/ml					
		1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h
Mercuriothiolate d'éthanolamine	6 mois	30		20		10	
Sulfate d'orthoxyquinoléine ...	6 mois	100		60	40		20
Bromure de cethexonium	6 mois	50	30		20		10
Acétylaminonitrothiazole	6 mois	200		100		50	20
Trichomycine	6 mois	80		40		20	

TABLEAU III

**CONCENTRATIONS LETHALES DE DIFFERENTES
SUBSTANCES POUR TRICHOMONAS VAGINALIS**

(Milieu N de l'Institut Pasteur - Souche S 4)

ESSAIS SUR CULTURE MIXTE

Substances à essayer	Age de la culture sur milieu N	Concentrations léthales en microgrammes/ml					
		1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h
Mercurothiolate d'éthanolamine	3 mois	20	15	10	5		2
	1 an	15	10		5		2
Sulfate d'orthoxyquinoléine ...	3 mois	30	25	20		10	
	1 an	30		20			10
Bromure de cethexonium	3 mois	40	30	20		10	
	1 an	50	40		30	20	
Acétylaminonitrothiazole	3 mois	250	200	150		50	
	1 an	250		150		100	
Trichomycine	3 mois	30	25	20		10	
	1 an	30			20		10
4,7-phénanthroline 5,6-quinone	3 mois	100	80		40		20
	1 an	100		80		40	

TABLEAU IV

CONCENTRATIONS LETHALES DE DIFFERENTES
SUBSTANCES POUR TRICHOMONAS VAGINALIS

(Milieu N de l'Institut Pasteur - Souche S 1)

ESSAIS SUR CULTURE MIXTE
ASSOCIATION TRICHOMONAS VAGINALIS + E. COLI

Substances à essayer	Age de la culture sur milieu N	Concentrations léthales en microgrammes/ml					
		1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h
Mercuriothiolate d'éthanolamine	6 mois	12	10	8			2
Sulfate d'orthoxyquinoléine ..	6 mois	100			60		40
Bromure de cethexonium	6 mois	140		100			40
Acétylaminonitrothiazole	6 mois	200		100			50
Trichomycine	6 mois	70		40			20
4,7-phénanthroline 5,6-quinone	6 mois	100	50		20		

TABLEAU V

**CONCENTRATIONS LETHALES DE DIFFERENTES
SUBSTANCES POUR TRICHOMONAS VAGINALIS**

(Milieu N de l'Institut Pasteur - Souche S 1)

**ESSAIS SUR CULTURE PURE MIXTE : ASSOCIATION
TRICHOMONAS VAGINALIS + STAPHYLOCOCCUS ALBUS.**

Substances à essayer	Age de la culture sur milieu N	Concentrations léthales en microgrammes/ml					
		1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h
Mercuriothiolate d'éthanolamine	6 mois	10	8	6		2	
Sulfate d'orthoxyquinoléine ...	6 mois	60		40			20
Bromure de cethexonium	6 mois	100		40		20	
Acétylaminonitrothiazole	6 mois	140	100		60		20
Trichomycine	6 mois	50		30	20		10
4-7-phénanthroline 5,6-quinone	6 mois	100		50		20	

TABLEAU VI

**CONCENTRATIONS LETHALES DE DIFFERENTES
SUBSTANCES POUR TRICHOMONAS VAGINALIS**

(Milieu C.P.L.M. - Souche S 1)

Substances à essayer	Age de la culture sur milieu CPLM	Concentrations léthales en microgrammes/ml					
		1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h
Mercuriothiolate d'éthanolamine	3 mois	10		6			2
	15 mois	6			4		2
Sulfate d'orthoxyquinoléine ..	3 mois	50		30			10
	15 mois	30		20			5
Bromure de cethexonium	3 mois	50		30			10
	15 mois	50	30			10	
Acétylaminonitrothiazole	3 mois	70		40			10
	15 mois	60	40		20	10	
Trichomycine	3 mois	30		20			10
	15 mois	20			10		5
4,7-phénanthroline 5,6-quinone	3 mois	60			30		10
	15 mois	60	30		10		

TABLEAU VII

**CONCENTRATIONS LETHALES DE DIFFERENTES
SUBSTANCES POUR TRICHOMONAS VAGINALIS**

(Milieu C.P.L.M. - Souche S 4)

Substances à essayer	Age de la culture sur milieu CPLM	Concentrations léthales en microgrammes/ml					
		1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h
Mercurothiolate d'éthanolamine	3 mois	10		6		4	
	6 mois	10			6		4
Sulfate d'orthoxyquinoléine ..	3 mois	20			10		5
	6 mois	30		20			10
Bromure de cethexonium	3 mois	30		20			5
	6 mois	20			10		5
Acétylaminonitrothiazole	3 mois	80			40		20
	6 mois	100			60		20
Trichomycine	3 mois	20			10		5
	6 mois	20		10		5	
4,7-phénanthroline 5,6-quinone	3 mois	80			40		20
	6 mois	100			40		20

TABLEAU VIII

**CONCENTRATIONS LETHALES DE DIFFERENTES
SUBSTANCES POUR TRICHOMONAS VAGINALIS**

(Milieu au thioglycollate - Souche S 1)

Substances à essayer	Age de la culture sur milieu au thiogly- collate	Concentrations léthales en microgrammes/ml					
		1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h
Mercuriothiolate d'éthanolamine	3 mois	12	10	8	6		2
	15 mois	8	6		2		
Sulfate d'orthoxyquinoléine ..	3 mois	50	30		10		
	15 mois	50		30			10
Bromure de cethexonium	3 mois	50		30			10
	15 mois	50		30		10	
Acétylaminonitrothiazole	3 mois	50		30			10
	15 mois	50	30			10	
Trichomycine	3 mois	25	20	15			5
	15 mois	15		10			5
4,7-phénanthroline 5,6-quinone	3 mois	100	80	60			20
	15 mois	60	40		20		10

TABLEAU IX

**CONCENTRATIONS LETHALES DE DIFFERENTES
SUBSTANCES POUR TRICHOMONAS VAGINALIS**

(Milieu au thioglycollate - Souche S 4)

Substances à essayer	Age de la culture sur milieu au thiogly- collate	Concentrations léthales en microgrammes/ml					
		1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h
Mercurothiolate d'éthanolamine	3 mois	12		8		4	2
	6 mois	8		4			2
Sulfate d'orthoxyquinoléine ..	3 mois	25	20		10		5
	6 mois	20			10		5
Bromure de cethexonium	3 mois	25		15			10
	6 mois	20			10		5
Acétylaminonitrothiazole	3 mois	60		40		20	10
	6 mois	60	40	20		10	
Trichomycine	3 mois	12		8			6
	6 mois	8			4		2
4,7-phénanthroline 5,6-quinone	3 mois	60		40			20
	6 mois	80			40		20

TABLEAU X

**CONCENTRATIONS LETHALES DE DIFFERENTES
SUBSTANCES POUR TRICHOMONAS VAGINALIS**

(Milieu de Magara - Souche S 1)

ESSAIS SUR SOUCHE PURE

Substances à essayer	Age de la culture sur milieu de Magara	Concentrations léthales en microgrammes/ml					
		1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h
Mercurothiolate d'éthanolamine	3 mois	20	15		10		5
	18 mois	20		15		10	5
Sulfate d'orthoxyquinoléine ...	3 mois	20	15	10		5	
	18 mois	25		25			5
Bromure de cethexonium	3 mois	50			30		20
	18 mois	70		50			30
Acétylaminonitrothiazole	3 mois	150	100			50	20
	18 mois	100		150			20
Trichomycine	3 mois	20	15		10		5
	18 mois	20		15		10	5
4,7-phénanthroline 5,6-quinone	3 mois	60		30	20		10
	18 mois	60			30	20	10

TABLEAU XI

**CONCENTRATIONS LETHALES DE DIFFERENTES
SUBSTANCES POUR TRICHOMONAS VAGINALIS**

(Milieu de Magara - Souche S 4)

ESSAIS SUR SOUCHE PURE

Substances à essayer	Age de la culture sur milieu de Magara	Concentrations léthales en microgrammes/ml					
		1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h
Mercurothiolate d'éthanolamine	3 mois	25	20	15	10		5
	9 mois	20	15	10		5	
Sulfate d'orthoxyquinoléine ..	3 mois	35		25		15	10
	9 mois	35	25		10		
Bromure de cethexonium	3 mois	80	60	40			10
	9 mois	60	40		10	5	
Acétylaminonitrothiazole	3 mois	80		50		20	
	9 mois	100			50		10
Trichomycine	3 mois	30		20			10
	9 mois	30			20		
4,7-phénanthroline 5,6-quinone	3 mois	120	80		40		20
	9 mois	100		80		40	20
Métronidazole	9 mois	50	30		20		10
	12 mois	50		20		10	

TABLEAU XII

**CONCENTRATIONS LETHALES DE DIFFERENTES
SUBSTANCES POUR TRICHOMONAS VAGINALIS**

(Milieu de Magara - Souche S 6)

ESSAIS SUR SOUCHE PURE

Substances à essayer	Age de la culture sur milieu de Magara	Concentrations léthales en microgrammes/ml					
		1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h
Mercurothiolate d'éthanolamine	3 mois	20	10	5		2	
Sulfate d'orthoxyquinoléine ...	3 mois	50	40	20	10	5	
Bromure de cethexonium	3 mois	70		40			20
Acétylaminonitrothiazole	3 mois	200		100		50	
Trichomycine	3 mois	100		60		20	
4,7-phénanthroline 5,6-quinone	3 mois	180			100		60
Métronidazole	3 mois	80		50			10

TABLEAU XIII

**CONCENTRATIONS LETHALES DE DIFFERENTES
SUBSTANCES POUR TRICHOMONAS VAGINALIS**

(Milieu de Magara - Souche S 8)

ESSAIS SUR SOUCHE PURE

Substances à essayer	Age de la culture sur milieu de Magara	Concentrations léthales en microgrammes/ml					
		1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h
Mercurothiolate d'éthanolamine	3 mois	25	10	5	2,5		
	7 mois	10	5	2,5			
Sulfate d'orthoxyquinoléine ..	3 mois	50	30	10	5		
	7 mois	50		20		10	
Bromure de cethexonium	3 mois	60	40	30	20	10	
	7 mois	50		20		10	
Acétylaminonitrothiazole	3 mois	200		100		50	
	7 mois	150		100		50	
Trichomycine	3 mois	50	40	30		20	
	7 mois	50		30		10	
4,7-phénanthroline 5,6-quinone	3 mois	150		80			40
	7 mois	100		60		40	20
Métronidazole	3 mois	50	30		10	5	
	7 mois	40	20		5		

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

Il nous reste maintenant à apporter quelques conclusions sur l'ensemble de notre travail.

Dans une première partie bibliographique, nous nous sommes efforcé de rassembler et de résumer toutes les notions ayant trait à notre sujet et dont la connaissance, pour le lecteur s'intéressant aux essais d'activité trichomonacide *in vitro*, nous a paru nécessaire.

Après avoir rappelé les caractères morphologiques et biologiques des *Trichomonas*, nous avons décrit le rôle important joué par la flore microbienne *in vivo* et *in vitro*. Nous avons vu que cette flore conditionne *in vitro* la survie des flagellés sur de nombreux milieux, mais qu'elle peut nuire également à la stabilité des souches.

L'examen des milieux de culture les plus couramment utilisés dans divers pays pour l'entretien des souches et les essais a fait l'objet d'un chapitre séparé ; enfin, nous avons achevé cette étude bibliographique par une brève description des principales techniques d'essais *in vitro* proposées par les auteurs.

Nous n'avons pas négligé, dans cette première partie, de faire certaines observations personnelles, notamment à propos de l'identification des *Trichomonas*, de leurs formes de résistance, du rôle de la flore associée et des techniques d'essais décrites.

La seconde partie a trait principalement à la description de nos travaux personnels qui ont consisté à effectuer des essais *in vitro*, en tubes et en cellules, dans le but d'apprécier l'activité trichomonacide de substances diverses.

Cette étude a été précédée d'un examen détaillé des milieux de culture utilisés et un chapitre a été consacré à l'étude des souches de flagellés. On comprend l'importance d'un tel chapitre, la mise en culture des souches de *Trichomonas* étant particulièrement importante dans le cadre de ce travail et plus ou moins délicate suivant les milieux employés.

Par ailleurs, nous avons vu que seule une souche parfaitement stabilisée nous paraît susceptible de donner des résultats reproductibles.

L'intérêt de cette constatation ne peut échapper si l'on admet que la standardisation d'une technique est fonction de la nature de la souche et de sa stabilité.

Les résultats de nos essais et les techniques utilisées ont été rassemblés en deux chapitres, dont l'un est consacré aux essais en tubes et le second aux essais en cellules de Nageotte.

1°) ESSAIS EN TUBES :

Nous avons donné la préférence aux méthodes fondées sur l'inhibition au départ des cultures. Elles consistent à déterminer la concentration minimale de produit capable d'inhiber le développement d'une culture pure ou impure.

La technique utilisée, simple et suffisamment standardisée, permet une sélection rapide des substances les plus diverses, mais assez solubles dans l'eau.

Nous avons ainsi effectué de nombreux essais sur des milieux différents et avec des souches d'âges variés, associées ou non à leur flore.

De ces essais, nous pouvons tirer quelques conclusions :

a) Aucun test d'activité trichomonacide ne peut être pratiqué sur un milieu quelconque si la souche n'est pas suffisamment adaptée à ce milieu, c'est-à-dire si sa stabilité n'est pas assurée.

b) Une technique d'essais peut être considérée comme valable si les résultats qu'elle fournit sont reproductibles dans le temps, les conditions de l'essai demeurant inchangées. Il est donc important de refaire les essais après un intervalle de temps suffisant pour s'assurer de la qualité d'une technique.

c) Dans l'essai d'une série nouvelle, il est nécessaire d'opérer comparativement avec une substance chimique connue, convenablement choisie et qui va servir de substance de référence (mercuriothiolate d'éthanolamine, sulfate d'orthoxyquinoléine, par exemple).

d) La flore associée, même en quantité modérée, constitue un élément assez mobile dont l'action sur les flagellés est imprécise ; aussi, nous paraît-il préférable d'utiliser un milieu favorisant la culture des flagellés à l'état pur.

Le milieu de Magara, qui répond à cette condition, rend possible l'entretien des souches de trichomonas, pendant de longues durées. Sur ce milieu, de préparation aisée, les souches présentent une stabilité que nous attribuons à l'absence de germes et qui convient particulièrement aux essais de substances trichomonacides d'activité inconnue.

Les résultats obtenus sont directement fonction de l'action de la substance et ne sont pas modifiés par la présence de la flore.

Enfin, la méthode doit pouvoir être appliquée aux substances peu solubles dans l'eau, à condition d'utiliser un solvant atoxique favorisant leur dispersion et augmentant leur pouvoir de pénétration intracellulaire.

Il serait intéressant de poursuivre des travaux dans ce sens et nous espérons, dans l'avenir, apporter quelques précisions sur les possibilités d'application de cette technique en tubes à la sélection de substances de solubilités très différentes.

II. — ESSAIS EN CELLULES :

Le principe de la technique retenue consiste à rechercher les concentrations léthales de substances qui correspondent à des temps de contact variant de une heure à six heures.

La technique proposée, relativement simple et rapide n'a pas toujours donné les résultats que l'on pouvait espérer, notamment avec les trichomonacides à action lente (acétylaminonitrothiazole, métronidazole) ; aussi ces substances n'ont-elles pas fourni des résultats parfaitement en accord avec leur activité trichomonacide réelle, telle que nous l'avons contrôlée par les essais en tubes.

Enfin, les résultats de ces essais ne paraissent pas suffisamment reproductibles pour que cette technique puisse être proposée, sans modifications, comme méthode de référence.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

1. ANDREWS (M. N.). — Observation on *Trichomonas vaginalis*. Donne 1837 with particular reference to its incidence in England and its cultivation. *Journ. of trop. Med. and Hyg.*, 1929, **32**, p. 237.
2. ASAMI (K.), KUBOTA (K.) et KOHZU (T.). — Influence de la flore associée sur la croissance de *Trichomonas vaginalis in vitro* et sur embryon de poulet. *Les infest. à Trichomonas*, Masson édit., 1957, p. 182.
3. ASAMI (K.), NODAKE (Y.) et MENO (T.). — Cultivation of *Trichomonas vaginalis* on a solid medium. *Exper. Parasit.*, 1955, **4**, p. 34.
4. BOCCI (A.) et DURANDO (C.). — Les formes de résistance de *Trichomonas* Donne. *Les infest. à Trichomonas*, Masson édit., 1957, p. 283.
5. BUSHBY (S. R. M.) et COPP (F. C.). — The antitrichomonal activity of amidonitrothiazoles. *Journ. of Pharm. and Pharmacol.*, 1955, **7**, p. 112.
6. CAVIER (R.). — Contribution à l'étude des propriétés trichomonacides de la 4,7-phénanthroline 5,6-quinone. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1961, **54**, p. 830.
7. CAVIER (R.) et MOSSION (X.). — Essais d'infestation expérimentale de la Rate par *Trichomonas vaginalis*. *C.R. Acad. Sciences*, 1956, **242**, p. 2412.
8. CAVIER (R.) et MOSSION (X.). — Nouveaux essais d'infestation expérimentale de la Rate par *Trichomonas vaginalis*. *C.R. Acad. Sciences*, 1956, **243**, p. 1807.
9. CAVIER (R.), SAVEL (J.) et QUEMERAIS (M. J.). — Sur une technique d'essai *in vivo* des substances trichomonacides. *C.R. Acad. Sciences*, 1959, **249**, p. 2641.
10. CAVIER (R.), SAVEL (J.) et QUEMERAIS (M. J.). — L'essai pharmacologique des médicaments trichomonacides sur la Rate expérimentalement infestée par *Trichomonas vaginalis*. *Thérapie*, 1960, **15**, p. 361.
11. CAVIER (R.), SAVEL (J.) et RUCART (G.). — Contribution à l'étude pharmacologique d'un médicament trichomonacide : l'acétylamino-2 nitro-5 thiazole. *Les infest. à Trichomonas*, Masson édit., 1957, p. 324.
12. CAVIER (R.), SAVEL (J.) et RUCART (G.). — Contribution à l'étude pharmacologique d'un médicament trichomonacide : l'acétylamino-2 nitro-5 thiazole. *Thérapie*, 1958, **13**, p. 502.
13. CHAPPAZ (G.). — Note sur la Trichomonase génitale humaine. *Bull. Acad. Nat. Med.*, 1953, 3^e S., **139**, p. 45.

14. CHAPPAZ (G.). — Aspects de la Trichomonase chez l'homme. *Les infest. à Trichomonas*, Masson édit., 1957, p. 127.
15. CHAPPAZ (G.), BERTRAND (P.) et FREAL (Cl.). — Critique des possibilités de contamination extra-vénérienne de la Trichomonase urogénitale. *Revue fr. Gynéc. Obst.*, 1961, **56**, p. 677.
16. COSAR (C.) et JULOU (L.). — Activité de (l'hydroxy-2' éthyl)-1-méthyl-2 nitro-5 imidazole (8.823 R.P.) vis-à-vis des infestations expérimentales à *Trichomonas vaginalis*. *Ann. Inst. Parasitol.*, 1959, **96**, p. 238.
17. CUCKLER (A. C.), KUPFERBERG (A. B.) et MILLMAN (N.). — Chemotherapeutic and tolerance studies on amino-nitro-thiazols. *Antibiot. and Chemother.*, 1955, **5**, p. 540.
18. DAVAINÉ (C.). — *C.R. Soc. Biol.*, 1854, **1**, p. 129.
19. DE CARNERI (I.). — Conservation of *Trichomonas vaginalis* on monobacterial cultures. *Amer. Journ. trop. Med. Hyg.*, 1956, **5**, p. 677.
20. DE CARNERI (I.). — Influenza del siero di Cavallo sulla crescita del *Trichomonas vaginalis* et *Trichomonas hominis* interreno fluido al tioglicolato. *Rivista di parasitologia*, oct. 1956, **17**, p. 247.
21. DE CARNERI (I.). — Isolation of *Trichomonas vaginalis* from fungi and bacteria. *Amer. Journ. trop. Med. Hyg.*, 1956, **5**, p. 210.
22. DE CARNERI (I.). — Conservation of *Trichomonas vaginalis* on monobacterial culture. *Amer. Journ. trop. Med. Hyg.*, 1956, **5**, p. 677.
23. DUREL (P.) et ROIRON M^{me} V.). — Découverte du *Trichomonas*. *Les infest. à Trichomonas*, Masson édit., 1957, p. 12.
24. FEINBERG (J.) et WHITTINGTON (J.). — A culture medium for *Trichomonas vaginalis* Donne and species of *Candida*. *Journ. Clin. Pathol.*, 1957, **10**, p. 327.
25. FILADORO (F.) et ORSI (N.). — Cultivation of *Trichomonas vaginalis* on a solid medium and its application to the essay of Trichomycine potency. *Antibiot. and Chemother.*, 1958, **8**, p. 561.
26. FILHO (A.). — Symptomatologie de la vaginite à *Trichomonas*. *Les infest. à Trichomonas*, Masson édit., 1957, p. 29.
27. GRASSE (P.). — *Traité de Zoologie*, Masson édit., 1952, Tome I, p. 704.
28. GUIGNARD (J. M. A.). — Etude de l'action de la conessine sur *Entamoeba dysenteriae in vitro*. *Thèse Doct. Méd.*, Bordeaux, 1949.
29. HARKNESS (A. H.). — La Trichomonase chez l'homme. *Les infest. à Trichomonas*, Masson édit., 1957, p. 107.
30. HAUSSMAN (D.). — *Roll. Berlin. A. Hirschwald*, 1870, p. 141.
31. HOEHNE (O.). — Die Behandlung der *Trichomonas vaginis* Kolpitis. *Zentrabl. f. Gynäk.*, 1916, **40**, p. 4.
32. INOKI (S.). — Expérience d'immunologie, de biochimie, de génétique sur *Trichomonas vaginalis*. *Les infest. à Trichomonas*, Masson édit., 1957, p. 265.
33. JEAN-BAPTISTE (J. A.). — Influence de l'acide qui salifie l'émétine sur la toxicité des sels de cet alcaloïde vis-à-vis de quelques Protistes *in vitro*. *Thèse Doct. Pharm.*, Paris, 1943.
34. JENEY (E.), ZSOLNAI (T.). — Versuche zur chemotherapeutischen Beeinflussung der durch *Trichomonas vaginalis* hervorgerufenen

- Infektionen. *Bakteriol. Parasitenk. Infek. Krankl. Hyg.*, 1958, **171**, p. 342.
35. JIRA (J.). — Les problèmes de la Trichomonase masculine. *Les infest. à Trichomonas*, Masson édit., 1957, p. 123.
36. JOHNSON (G.). — Physiology of bacteria-free culture of *Trichomonas vaginalis*. *Journ. of Parasit.*, 1942, **28**, p. 369.
37. JOHNSON (G.) et TRUSSEL (R. E.). — Experimental basis for the chemotherapy of *Trichomonas vaginalis* infestations. *Proc. Soc. exper. Biol. Med.*, 1943, **54**, p. 245.
38. JOUMANA-NEHME. — Etude de *Trichomonas vaginalis in vitro*. Essai des Trichomonacides. *Thèse Doct. Pharm.*, Beyrouth, 1961.
39. KOFOID (C. A.) et SWEZY (O.). — *Proc. Amer. Acad. Arts and Sciences*, 1915, **51**, p. 289.
40. KÜCERA (K.). — Epidémiologie de la Trichomonase vaginale. *Les infest. à Trichomonas*, Masson édit., 1957, p. 201.
41. KUNSTLER (G.). — *C.R. Acad. Sciences*, 1883, **97**, p. 755.
42. LAMY (L.). — Technique générale de culture des protozoaires parasites des voies digestives et génitales. *Biol. Méd.*, 1953, **42**, p. 209.
43. LAMY (L.). — Interprétation des rapports entre flore bactérienne associée et activité des substances antibiotiques dans les essais chimiothérapeutiques sur *Trichomonas vaginalis* en culture. *C.R. Soc. Biol.*, 1957, **151**, p. 665.
44. LAMY (L.). — Milieu de culture simplifié pour *Trichomonas foetus*. *Ann. Inst. Pasteur*, 1959, **97**, p. 115.
45. LAPIERRE (J.). — Introduction à l'étude des formes de résistance de *Trichomonas vaginalis* Donne. *Les infest. à Trichomonas*, Masson édit., 1957, p. 271.
46. LASH (J.). — L'effet des bactéries vaginales et de leurs produits du métabolisme sur la courbe de croissance de *Trichomonas vaginalis*. *Les infest. à Trichomonas*, Masson édit., 1957, p. 253.
47. LASH (J.). — Protein hydrolysate enriched media for the propagation of *Trichomonas vaginalis*. *Amer. Journ. trop. Med.*, 1948, **28**, p. 111.
48. LUTZ (A.). — Nature et rôle possible de la flore d'accompagnement de *Trichomonas vaginalis*. *Les infest. à Trichomonas*, Masson édit., 1957, p. 179.
49. LYNCH (K. M.). — *Amer. Journ. trop. Diseases*, 1915, **3**, p. 677.
50. LYNCH (K. M.). — *Amer. Journ. trop. Diseases*, 1915, **3**, p. 231.
51. LYNCH (J. E.). — Effect of anisomycin on the growth of *Trichomonas vaginalis*. *Antibiot. and Chemother.*, 1955, **5**, p. 300.
52. LYNCH (J. E.), HOLLEY (E. C.) et MARGISON (J. E.). — Studies on the use of the mouse as a laboratory animal for the evaluation of anti-trichomonal agents. *Antibiot. and Chemother.*, 1955, **5**, p. 508.
53. MACDONALD (E. M.). — *In vitro* action of various chemical agents on *Trichomonas hominis*, *Trichomonas vaginalis* and *Trichomonas foetus*. *Journ. of Immunol.*, 1949, **59**, p. 301.
54. MACENTEGART (M. G.). — The maintenance of stock strains of *Trichomonas* by freezing. *Journ. Hyg.*, 1954, **52**, p. 545.

55. MAGARA (M.), AMINO (E.) et YOKOUTI (E.). — One method for the pure culture of *Trichomonas vaginalis*. *The Amer. Journ. trop. Med. Hyg.*, 1953, 2, p. 267.
56. MANDOUL (M. R.) et PESTRE (M.). — Pluralité des espèces de *Trichomonas* parasites de l'homme. *Les infest. à Trichomonas*, Masson édit., 1957, p. 229.
57. MICHALZIK (K.). — Contribution à la morphologie et à la biologie de *Trichomonas vaginalis*. *Les infest. à Trichomonas*, Masson édit., 1957, p. 277.
58. MORENAS (L.). — Etude morphologique et biologique sur les flagellés intestinaux. *Ann. Univers. Lyon*, 1938, 3^e série Médecine, Fasc. I.
59. MOSSION (X.). — Contribution à l'étude de la biologie de *Trichomonas vaginalis*. Infestation expérimentale des animaux de laboratoire. *Thèse Doct. Pharm.*, Paris, 1959.
60. PIETTE (M.). — Contribution à l'étude expérimentale et thérapeutique de la conessine. *Thèse Doct. Méd.*, Paris, 1948.
61. POWELL (W. N.). — *Amer. Journ. Hyg.*, 1936, 24, p. 145.
62. PRAY (E. G.). — The effects of various bacteria and their metabolites on growth of *Trichomonas vaginalis* *in vitro*. *Journ. Parasitol.*, 1952, 38, p. 398.
63. ROIRON-RATNER (M^{me} V.). — Etude comparative des principaux milieux de culture de *Trichomonas vaginalis*. *Les infest. à Trichomonas*, Masson édit., 1957, p. 244.
- 63 bis. — ROM (R. de) et DEMOL (R.). — La valeur comparée de différentes méthodes de diagnostic de la *Trichomonase* vaginale. *Les infest. à Trichomonas*, Masson édit., 1957, p. 86.
64. SAGONE (M.). — Action d'un nouvel amœbicide synthétique sur certains types de parasitose intestinale. *Med. Trop.*, 1958, 18, p. 642.
65. SAKAI (S.), KABAYASHI (M.) et SAITO (G.). — Zur Chemotherapie der *Trichomonaden* Infektionen : *in vitro* Untersuchungen über thiuramdisulfiden und dithiocarbamines sauren Salzen. *Journ. of the Scientific. Res. Inst.*, 1957, 51, p. 91.
66. SAMUEL (K. W.). — The maintenance of *Trichomonas vaginalis* on a solid medium. *Journ. of Parasitol.*, 1954, 40, p. 100.
67. SAVEL (J.). — La culture de *Trichomonas vaginalis* Donne. *C.R. Soc. Fr. Gynécol.*, 1957, 4, p. 159.
68. SOREL (C.). — Trois techniques de recherche du *Trichomonas vaginalis*. *Presse Médicale*, 1954, 62, p. 602.
69. SPRINCE (J. H.) et KUPFERBERG (A. B.). — The separation of human blood serum into two fractions both essential for the sustained growth of *Trichomonas vaginalis*. *Journ. Bacteriol.*, 1947, 53, p. 441.
70. TRUSSEL (R. E.). — *Trichomonas vaginalis*. C. C. Thomas édit., Springfield, Illinois, 1947, p. 50.
71. TRUSSEL (R. E.). — *Trichomonas vaginalis*, C. C. Thomas édit., Springfield, Illinois, 1947, p. 22.
72. TRUSSEL (R. E.). — *Trichomonas vaginalis*, C. C. Thomas édit., Springfield, Illinois, 1947, p. 126.

73. TRUSSEL (R. E.) et PLASS (E. D.). — Pathog. and Physiol. of pure culture of *Trichomonas vaginalis*. *Amer. Journ. Obst. and Gyn.*, 1940, **40**, p. 883.
 74. VIGNES (H.). — Les vaginites à *Trichomonas*. *Presse Médicale*, 1932, **40**, p. 419.
 75. WENRICH (D. M.). — Comparative morphology of the Trichomonad flagellates of man. *Amer. Journ. trop. Med.*, 1944, **24**, p. 39.
 76. WHITTINGTON (M. J.). — Trichomonase du tractus urinaire féminin. *Les infest. à Trichomonas*, Masson édit., 1957, p. 79.
 77. WILKINS (J. R.) et HENSHAW (C. T.). — The effect of endomycin and other antibiotics on *Trichomonas vaginalis in vitro*. *Exper. Parasit.*, 1954, **3**, p. 417.
-

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION. — <i>Importance de la Trichomonase en pathologie humaine</i>	1
--	---

PREMIÈRE PARTIE

CHAPITRE PREMIER. — <i>Généralités sur les Trichomonas</i>	11
§ 1. Pluralité des espèces de <i>Trichomonas</i>	11
§ 2. Caractères distinctifs des <i>Trichomonas</i> humains	12
§ 3. Généralités sur la biologie des <i>Trichomonas</i>	19
§ 4. Epidémiologie - Pathogénie et Symptomatologie de la <i>Trichomonase</i>	23

CHAPITRE II. — <i>Etude de la flore associée à Trichomonas vaginalis. Importance du rôle joué par cette flore « in vivo et in vitro »</i>	27
§ 1. La flore au niveau du vagin normal et parasité, son rôle <i>in vivo</i>	27
§ 2. Influence de la flore associée sur la croissance de <i>Trichomonas vaginalis in vitro</i>	30

CHAPITRE III. — <i>Les milieux de culture utilisés pour l'entretien des Trichomonas et pour les tests « in vitro »</i>	35
§ 1. Généralités	35
§ 2. Importance du sérum sanguin pour la culture des <i>Trichomonas in vitro</i>	37
§ 3. Etude des principaux milieux diphasiques utilisés pour la culture des <i>Trichomonas</i>	39
§ 4. Principaux milieux monophasiques utilisés pour la culture des <i>Trichomonas</i>	43

CHAPITRE IV. — <i>Description de quelques techniques d'essais utilisées pour la détermination « in vitro » de l'activité trichomonacide et trichomonastatique de différentes substances</i>	57
— Généralités	57
— Plan du chapitre	60
§ 1. Essais d'activité trichomonacide	61
A. Tests en tubes	61
1. Essais sur milieux diphasiques (souches impures)	61

2. Essais sur milieux monophasiques liquides (souches pures)	63
3. Essais sur milieux monophasiques solides	72
B. Tests par contact direct entre lame et lamelle	74
§ 2. Essais d'activité trichomonastatique	75

DEUXIÈME PARTIE

But de nos travaux	79
Généralités sur le choix d'une technique d'essai	80
Plan de la seconde partie	85
CHAPITRE PREMIER. — Les milieux utilisés pour l'entretien de nos souches et pour les essais « in vitro »	87
§ 1. Le milieu diphasique N de l'Institut Pasteur	88
§ 2. Le milieu monophasique de JOHNSON et TRUSSEL dit milieu C.P.L.M.	92
§ 3. Le milieu monophasique au thioglycollate	94
§ 4. Le milieu de MAGARA	94
CHAPITRE II. — Etude des souches de trichomonas	99
— Généralités : Importance dans le cadre de ces travaux de la nature et de l'âge des souches	99
§ 1. Prélèvement des flagellés	100
§ 2. Méthode d'examen des flagellés	100
§ 3. Problème de l'adaptation des souches à un milieu déterminé	101
§ 4. Morphologie des flagellés sur les différents milieux utilisés	106
CHAPITRE III. — Substances trichomonacides utilisées dans nos travaux	107
§ 1. Mercurothiolate d'éthanolamine	108
§ 2. Bromure de cethexonium	109
§ 3. Sulfate d'orthoxyquinoléine	110
§ 4. Acétylaminonitrothiazole	111
§ 5. Trichomycine	112
§ 6. 4,7-phénanthroline 5,6-quinone	115
§ 7. Métronidazole	116
CHAPITRE IV. — Essais d'activité trichomonacide pratiqués en tubes de cultures	119
A. Technique utilisée pour les tests en tubes	119
§ 1. Généralités	119
§ 2. Principe de la technique d'essai	121
§ 3. Description détaillée de la technique d'essai	121

a) <i>Première étape</i> : dilution de la substance à essayer et introduction de la quantité calculée dans les tubes de culture	122
b) <i>Deuxième étape</i> : ensemencement des milieux avec un nombre déterminé de flagellés	131
c) <i>Troisième étape</i> : incubation à 37° C de tous les milieux ensemencés	133
B. Résultats obtenus	133
§ 1. Expression des résultats	133
§ 2. Résultats des essais effectués sur les différents milieux. Discussion des résultats	134
— Interprétation des essais d'activité trichomonacide en tubes	141
— Choix d'une substance étalon	141
— Tableaux de résultats	143
CHAPITRE V. — <i>Les essais en cellules de Nageotte</i>	151
A. Description des techniques utilisées	151
§ 1. Principe général des méthodes	151
§ 2. Inconvénients des essais par contact entre lame et lamelle	152
§ 3. Avantages des essais en cellules	152
§ 4. Techniques d'essai employées	153
— Première technique	153
— Deuxième technique	156
<i>Première étape</i> : dilution de la substance à essayer et répartition sur les cellules	157
<i>Deuxième étape</i> : préparation de la suspension de Trichomonas et répartition sur les cellules	160
<i>Troisième étape</i> : mise en route de l'essai et examen horaire pendant six heures ; expression des résultats	161
B. Résultats obtenus	163
§ 1. Généralités	163
§ 2. Etude comparative des résultats	163
— Discussion des résultats	169
— Critique des essais en cellules	169
— Tableaux de résultats	174
RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS	187
INDEX BIBLIOGRAPHIQUE	191

